

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**  
**FACULTAD DE MEDICINA**

**INSULINA Y NUTRIENTES COMO MODULADORES  
DE IGF Y SUS PROTEINAS LIGADORAS EN EL  
DESARROLLO DE LA RATA**

**TESIS DOCTORAL**

**FRANCISCO JOSÉ RIVERO CRESPO**  
**MADRID 1994**



DEPARTAMENTO DE BIOQUIMICA  
FACULTAD DE MEDICINA  
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE

CIUDAD UNIVERSITARIA  
28040 MADRID (SPAIN)

ENRIQUE BLAZQUEZ FERNANDEZ, DIRECTOR DEL DEPARTAMENTO DE  
BIOQUIMICA Y BIOLOGIA MOLECULAR III DE LA FACULTAD DE MEDICINA DE LA  
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID,

HACE CONSTAR: que el trabajo "Insulina y nutrientes como moduladores de IGF  
y sus proteínas ligadoras en el desarrollo de la rata" realizado  
por **D. Francisco José Rivero Crespo** bajo la dirección de la Dra.  
Ana María Pascual-Leone Pascual, Investigador Científico del  
CSIC, se encuentra en condiciones de ser presentado y  
defendido públicamente como Tesis Doctoral.

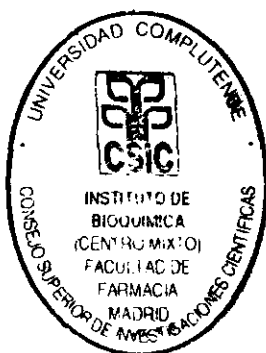
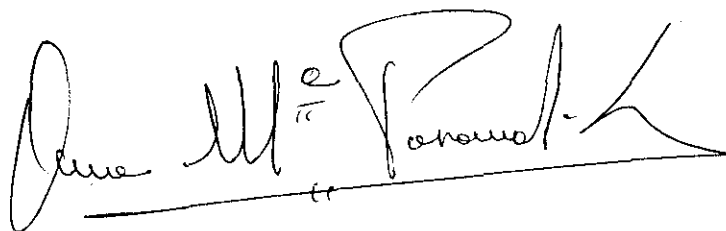
Para que conste a los efectos oportunos, firmo la presente en  
Madrid, a catorce de diciembre de mil novecientos noventa y  
tres.



ANA MARIA PASCUAL-LEONE PASCUAL, INVESTIGADOR CIENTIFICO DEL  
 C.S.I.C. Y DIRECTORA DEL INSTITUTO DE BIOQUIMICA (CENTRO MIXTO  
 C.S.I.C.-U.C.M.)

HACE CONSTAR: que el trabajo "Insulina y nutrientes como moduladores de IGF  
 y sus proteínas ligadoras en el desarrollo de la rata", realizado  
 bajo mi dirección por **D. Francisco José Rivero Crespo**, tiene a  
 mi juicio méritos suficientes para optar al Grado de Doctor.

Para que conste a los efectos oportunos, firmo la presente en  
 Madrid, a catorce de diciembre de mil novecientos noventa y  
 tres.

Fdo: Dra. A. M. Pascual-Leone Pascual.

**INSULINA Y NUTRIENTES COMO MODULADORES DE IGF Y SUS PROTEINAS  
LIGADORAS EN EL DESARROLLO DE LA RATA**

Memoria que presenta **Francisco José Rivero Crespo** para  
aspirar al grado de Doctor en Medicina y Cirugía

Director: Ana María Pascual-Leone Pascual  
Investigador Científico del CSIC.

Universidad Complutense de Madrid. Facultad de Medicina

- Año 1994 -



Este trabajo ha sido realizado en el grupo de Endocrinología y Metabolismo Perinatales que dirige la Dra. Pascual-Leone en el Instituto de Bioquímica, Centro Mixto (CSIC-UCM), Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid, entre los años 1990-1993, disfrutando durante este periodo de una Beca de Formación de Personal Investigador del CSIC.

Deseo expresar mi agradecimiento al Profesor D. Manuel Ruiz Amil, Jefe del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Facultad de Farmacia por su acogida en el mismo.

A la Dra. Ana María Pascual-Leone Pascual, directora de esta Tesis, mi más sincera gratitud por su orientación y apoyo científico constantes, así como por el entusiasmo puesto en la realización de este trabajo de investigación.

A mis compañeros del grupo de Endocrinología y Metabolismo Perinatales, Cecilia Aláez, Carmen Alvarez, Judith Cacho, Fernando Escrivá, Luis Goya y María Angeles Martín, mi reconocimiento por su colaboración y amistad. Agradezco especialmente a Luis Goya su inestimable ayuda en la puesta a punto del método de "Western immunoblot".

Finalmente, agradezco la colaboración de Fernando González y Adoración Urrea, personal técnico de nuestro grupo, así como la inestimable labor de Manuel Escobosa y Angel García en el animalario del Centro, y la cooperación y amistad por parte de todos (investigadores, becarios, personal administrativo y de servicios) cuantos ejercen su labor en el Centro.

**A SYLVIA**



## INDICE

	Página
<b>ABREVIATURAS</b> . . . . .	16
<b>1.INTRODUCCION</b> . . . . .	19
1.1. <u>Estructura y acciones biológicas de los IGFs y sus proteínas ligadoras</u> . . . . .	20
1.1.1. Visión de conjunto . . . . .	20
1.1.2. Los factores de crecimiento similares a insulina . . . . .	20
1.1.2.1. Introducción histórica . . . . .	20
1.1.2.2. Estructura . . . . .	21
1.1.2.3. Genes y precursores biosintéticos . . . . .	22
1.1.2.4. Orígen, síntesis, secreción y circulación . . . . .	23
1.1.2.5. Regulación de la producción . . . . .	24
1.1.2.5.1. Factores hormonales . . . . .	24
1.1.2.5.2. Factores nutricionales . . . . .	26
1.1.2.5.3. Factores relacionados con el desarrollo . . . . .	26
1.1.2.5.4. Factores específicos de tejido . . . . .	26
1.1.2.6. Acciones de los IGFs . . . . .	27
1.1.2.6.1. Acciones <i>in vitro</i> . . . . .	27
1.1.2.6.2. Acciones <i>in vivo</i> . . . . .	28
1.1.2.6.3. Acciones autocrinas, paracrinas y endocrinas . . . . .	30
1.1.3. Proteínas ligadoras de IGF . . . . .	31
1.1.3.1. Estructura . . . . .	31
1.1.3.2. Propiedades de unión . . . . .	32
1.1.3.3. La subunidad ácido-lábil. . . . .	33
1.1.3.4. IGFBPs en suero y otros líquidos biológicos . . . . .	33
1.1.3.5. Expresión génica y regulación . . . . .	34
1.1.3.5.1. IGFBP-1 . . . . .	35
1.1.3.5.2. IGFBP-2 . . . . .	36
1.1.3.5.3. IGFBP-3 . . . . .	37
1.1.3.5.4. IGFBP-4, 5 y 6 . . . . .	38
1.1.3.6. Papel biológico . . . . .	39
1.1.4. Receptores de IGF . . . . .	41
1.1.4.1. Estructura . . . . .	41
1.1.4.1.1. Receptor tipo I . . . . .	41
1.1.4.1.2. Receptor tipo II . . . . .	42
1.1.4.2. Propiedades de unión . . . . .	43
1.1.4.3. Transducción de señales . . . . .	44

1.1.4.4. Regulación . . . . .	45
1.1.4.5. Papel biológico . . . . .	45
1.2. <u>Papel de la insulina y los IGFs en el desarrollo fetal y neonatal</u> . . . . .	46
1.2.1. Control hormonal del crecimiento fetal . . . . .	46
1.2.2. Papel de la insulina en el desarrollo fetal. . . . .	47
1.2.2.1. Desarrollo ontogénico de la insulina y su receptor . . . . .	48
1.2.3. Papel del sistema IGF durante el desarrollo . . . . .	49
1.2.3.1. Desarrollo ontogénico de los IGFs . . . . .	49
1.2.3.1.1. Niveles circulantes de IGF-I y II . . . . .	49
1.2.3.1.2. Expresión de los genes de IGF-I y II . . . . .	50
1.2.3.2. Desarrollo ontogénico de las IGFBPs . . . . .	51
1.2.3.2.1. IGFBPs circulantes . . . . .	51
1.2.3.2.2. IGFBPs en tejidos . . . . .	52
1.2.3.3. Desarrollo ontogénico de los receptores de IGF . . . . .	52
1.2.3.3.1. Receptor tipo I . . . . .	52
1.2.3.3.2. Receptor tipo II . . . . .	53
1.2.4. Interrelaciones entre la insulina y los IGFs . . . . .	54
1.2.5. IGFs e IGFBPs durante la gestación . . . . .	55
1.3. <u>IGFs, estado nutricional e insulina</u> . . . . .	56
1.3.1. IGFs y estado nutricional . . . . .	56
1.3.1.1. IGFs como señales de crecimiento dependientes de nutrientes . . . . .	56
1.3.1.2. Regulación de los IGFs por el estado nutricional . . . . .	57
1.3.1.2.1. Ayuno . . . . .	58
1.3.1.2.2. Restricción proteica . . . . .	58
1.3.1.2.3. Restricción calórica . . . . .	59
1.3.1.3. Regulación de las IGFBPs por el estado nutricional . . . . .	59
1.3.1.4. Regulación de los receptores de IGF por el estado nutricional . . . . .	60
1.3.1.5. Regulación nutricional de los IGFs y las IGFBPs en el feto . . . . .	60
1.3.2. IGFs e insulina: efectos de la diabetes en la regulación de los IGFs . . . . .	61
1.3.2.1. Efectos de la diabetes en la regulación de IGF-I . . . . .	61
1.3.2.2. IGFBPs y diabetes . . . . .	62
1.3.2.3. Receptores de IGF y diabetes . . . . .	62
1.3.3. Consideraciones finales. Justificación de los modelos de subnutrición y diabetes empleados en este trabajo . . . . .	63

1.4. <u>Estado actual de la metodología para el estudio de los IGFs y sus proteínas ligadoras circulantes</u> . . . . .	65
1.4.1. Cuantificación de IGF-I y II . . . . .	65
1.4.2. Metodología para el estudio de las IGFBPs . . . . .	66
1.4.2.1. Técnicas de "blotting" . . . . .	67
1.5. <u>Planteamiento del tema</u> . . . . .	68
<b>2. MATERIAL Y METODOS</b> . . . . .	72
2.1. <u>Animales y tratamientos</u> . . . . .	73
2.1.1. Composición de la dieta general . . . . .	73
2.1.2. Modelo de subnutrición desde la etapa gestante . . . . .	74
2.1.3. Pauta de realimentación . . . . .	75
2.1.3.1. Ratas neonatales . . . . .	75
2.1.3.2. Ratas adultas . . . . .	75
2.1.4. Modelo de diabetes por estreptozotocina . . . . .	75
2.1.5. Pauta de tratamiento sustitutivo con insulina . . . . .	75
2.1.5.1. Ratas neonatales . . . . .	76
2.1.5.2. Ratas adultas . . . . .	76
2.1.6. Realimentación y tratamiento con insulina de ratas adultas subnutridas y diabéticas . . . . .	76
2.1.7. Recogida de muestras . . . . .	77
2.1.7.1. Recogida y conservación de muestras de rata neonatal y adulta . . . . .	77
2.1.7.2. Recogida y conservación de muestras de fetos y gestantes . . . . .	77
2.1.7.3. Preparación de suero patrón de rata . . . . .	78
2.1.7.4. Recogida y conservación de las muestras de hígado de rata adulta para RRA . . . . .	78
2.1.7.5. Otras muestras . . . . .	78
2.2. <u>Métodos de separación de las IGFBPs</u> . . . . .	78
2.2.1. Filtración en gel . . . . .	79
2.2.1.1. Principio . . . . .	79
2.2.1.2. Material y reactivos . . . . .	79
2.2.1.3. Calibración de las columnas . . . . .	79
2.2.1.3.1. Calibración mediante espectrofotometría . . . . .	79
2.2.1.3.2. Calibración mediante RIA . . . . .	80
2.2.1.4. Filtración de los sueros . . . . .	81

2.2.1.5. Recuperación de IGF filtrado . . . . .	81
2.2.2. Extracción en ácido fórmico-acetona . . . . .	81
2.2.2.1. Procedimiento . . . . .	81
2.2.2.2. Recuperación de IGF en el extracto . . . . .	83
2.2.3. Extracción en ácido-etanol con crioprecipitación . . . . .	83
2.2.3.1. Procedimiento . . . . .	83
2.2.3.2. Recuperación de IGF en el extracto . . . . .	83
2.3. <u>Marcaje radiactivo de IGF-I y II</u> . . . . .	83
2.3.1. Principio . . . . .	83
2.3.2. Material y reactivos . . . . .	84
2.3.3. Procedimiento . . . . .	85
2.3.4. Cálculo del rendimiento y la actividad específica . . . . .	85
2.3.5. Perfil de elución de radiactividad tras el marcaje radiactivo de IGFs . . . . .	85
2.3.6. Repurificación del IGF-I marcado . . . . .	88
2.4. <u>Determinación de la concentración sérica de hormonas mediante RIA</u> . . . . .	88
2.4.1. Principio del método . . . . .	88
2.4.2. RIA de IGF-I . . . . .	90
2.4.2.1. Material y reactivos para el RIA de IGF-I . . . . .	90
2.4.2.2. Titulación del antisuero anti-IGF-I . . . . .	90
2.4.2.3. Propiedades del antisuero anti-IGF-I . . . . .	91
2.4.2.4. RIA de IGF-I en muestras filtradas y extraídas en ácido fórmico-acetona . . . . .	91
2.4.2.5. RIA de muestras sometidas a extracción en ácido-etanol . . . . .	94
2.4.2.6. Especificidad del RIA de IGF-I . . . . .	94
2.4.2.6.1. Uso de un patrón heterólogo . . . . .	94
2.4.2.6.2. Reacción cruzada con péptidos análogos . . . . .	94
2.4.2.7. Variación intra e interensayo . . . . .	95
2.4.3. RIA de insulina . . . . .	95
2.4.3.1. Material y reactivos. . . . .	95
2.4.3.2. Procedimiento del análisis . . . . .	97
2.4.4. Cálculos . . . . .	97
2.5. <u>Determinación de la concentración sérica de IGF-II mediante RRA</u> . . . . .	98
2.5.1. Principio . . . . .	98
2.5.2. Preparación de membrana plasmática particulada de hígado de rata . . . . .	99
2.5.3. Evaluación de la preparación de membranas . . . . .	99



2.5.4. Material y reactivos . . . . .	99
2.5.5. Preparación de las muestras . . . . .	101
2.5.6. Procedimiento del análisis . . . . .	101
2.5.7. Especificidad del RRA de IGF-II . . . . .	102
2.5.7.1. Uso de un patrón heterólogo . . . . .	102
2.5.7.2. Reacción cruzada con péptidos análogos . . . . .	102
2.5.8. Variación intra e interensayo . . . . .	102
2.5.9. Cálculos . . . . .	102
 2.6. <u>Otras determinaciones analíticas</u> . . . . .	 104
2.6.1. Análisis de la glucemia . . . . .	104
2.6.1.1. Glucosa en sangre total . . . . .	104
2.6.1.2. Glucosa en sangre desproteinizada . . . . .	104
2.6.1.3. Determinación de la glucemia fetal en estado postabsortivo . . . . .	104
2.6.2. Determinación de la concentración de proteínas por el método de Lowry . . . . .	104
 2.7. <u>Análisis de las proteínas ligadoras de IGF mediante "Western blot"</u> . . . . .	 105
2.7.1. Fundamento . . . . .	105
2.7.2. Electroforesis . . . . .	105
2.7.2.1. Preparación del gel . . . . .	105
2.7.2.2. Preparación y aplicación de las muestras . . . . .	106
2.7.2.3. Protocolo de diluciones . . . . .	106
2.7.2.4. Condiciones de la electroforesis . . . . .	107
2.7.3. Transferencia . . . . .	107
2.7.3.1. Material y reactivos . . . . .	107
2.7.3.2. Procedimiento . . . . .	107
2.7.4. Tinción con azul Coomasie. Estimación de los pesos moleculares . . . . .	107
2.7.5. "Western ligand blot" . . . . .	108
2.7.5.1. Reactivos . . . . .	108
2.7.5.2. Preparación de la membrana . . . . .	108
2.7.5.3. Incubación con el radioligando . . . . .	109
2.7.5.4. Lavado, exposición y revelado . . . . .	109
2.7.5.5. Cuantificación densitométrica de las autorradiografías. . . . .	109
2.7.6. "Western immunoblot" . . . . .	110
2.7.6.1. Reactivos . . . . .	110
2.7.6.2. Preparación de la membrana . . . . .	110
2.7.6.3. Incubación con el anticuerpo primario . . . . .	111
2.7.6.4. Incubación con el anticuerpo secundario . . . . .	111
2.7.6.5. Revelado de la membrana . . . . .	111

2.7.7. Evaluación de los anticuerpos anti-IGFBPs en el "Western immunoblot". Comparación con el "Western ligand blot" . . . . .	112
2.8. <u>Estudio del ligamiento de IGF-I y II a membranas de hígado, cerebro y placenta de rata</u> . . . . .	113
2.8.1. Principio . . . . .	113
2.8.2. Preparación de membranas . . . . .	113
2.8.3. Cuantificación del ligamiento de IGF a membranas . . . . .	113
2.8.3.1. Material y reactivos. . . . .	113
2.8.3.2. Procedimiento del análisis . . . . .	115
2.8.4. Determinación de la degradación del radioligando . . . . .	115
2.8.5. Caracterización del ligamiento de IGF a preparaciones de membrana plasmática . . . . .	116
2.8.5.1. Evaluación de la calidad de la albúmina empleada . . . . .	116
2.8.5.2. Temperatura y tiempo de incubación . . . . .	116
2.8.5.3. Concentración de proteínas . . . . .	117
2.8.5.3.1. IGF-I . . . . .	117
2.8.5.3.2. IGF-II . . . . .	118
2.8.6. Análisis de Scatchard . . . . .	118
2.9. <u>Cálculos estadísticos</u> . . . . .	122
2.9.1. Cálculos básicos . . . . .	122
2.9.2. Análisis de la varianza . . . . .	122
2.9.3. Regresión lineal y correlación . . . . .	123
3. <b>RESULTADOS</b> . . . . .	124
3.1. <u>Estudio comparativo de tres métodos de separación de IGFBPs del suero</u> . . . . .	125
3.1.1. Niveles de IGF-I en suero . . . . .	125
3.1.2. Estudio de regresión lineal y correlación . . . . .	126
3.1.3. Evaluación de los métodos de separación de IGFBPs mediante "Western ligand blot" . . . . .	126
3.1.3.1. Autorradiografías . . . . .	126
3.1.3.2. Análisis densitométrico . . . . .	129
3.1.3.2.1. IGFBP 40-50 kDa . . . . .	129
3.1.3.2.2. IGFBP 30 kDa . . . . .	130
3.1.3.2.3. IGFBP 24 kDa . . . . .	130

3.2. <u>Subnutrición y diabetes en periodo fetal</u> . . . . .	135
3.2.1. Evolución del peso corporal en la rata gestante . . . . .	135
3.2.2. Glucemia e insulinemia en la rata gestante . . . . .	136
3.2.3. Niveles de IGF-I en suero de rata gestante . . . . .	136
3.2.4. Análisis de las IGFBPs del suero de rata gestante . . . . .	140
3.2.4.1. "Western ligand blot" . . . . .	140
3.2.4.2. Análisis comparativo mediante "Western ligand blot" y "Western immunoblot" . . . . .	140
3.2.4.3. Cuantificación densitométrica . . . . .	141
3.2.5. Resumen de los resultados obtenidos en ratas gestantes . . . . .	141
3.2.6. Evolución del peso corporal fetal . . . . .	145
3.2.7. Glucemia e insulinemia fetales . . . . .	145
3.2.8. Niveles de IGF-II en suero fetal . . . . .	146
3.2.9. Niveles de IGF-I en suero fetal . . . . .	146
3.2.10. Análisis de las IGFBPs en suero fetal . . . . .	146
3.2.10.1. IGFBPs en suero fetal normal. Análisis mediante "Western ligand blot" . . . . .	146
3.2.10.2. IGFBPs en suero de fetos procedentes de ratas gestantes subnutridas y diabéticas. Análisis mediante "Western ligand blot" . . . . .	149
3.2.10.3. Análisis comparativo mediante "Western ligand blot" y "Western immunoblot" . . . . .	149
3.2.10.4. Cuantificación densitométrica . . . . .	152
3.2.11. Estudio del ligamiento de IGF-I y II a preparaciones de membrana plasmática . . . . .	152
3.2.11.1. Hígado . . . . .	157
3.2.11.2. Cerebro . . . . .	157
3.2.11.3. Placenta . . . . .	157
3.2.12. Resumen de los resultados obtenidos en fetos . . . . .	159
3.3. <u>Subnutrición y diabetes en periodo neonatal</u> . . . . .	159
3.3.1. Evolución del peso corporal . . . . .	159
3.3.2. Glucemia e insulinemia . . . . .	160
3.3.3. Niveles de IGF-I y II en suero . . . . .	160
3.3.4. IGFBPs en suero neonatal . . . . .	164
3.3.4.1. "Western ligand blot" . . . . .	164
3.3.4.2. Análisis comparativo mediante "Western ligand blot" y "Western immunoblot" . . . . .	164
3.3.4.3. Cuantificación densitométrica . . . . .	165

3.3.5. Estudio del ligamiento de IGF-I y II a preparaciones de membrana plasmática . . . . .	165
3.3.5.1. Hígado . . . . .	170
3.3.5.2. Cerebro. . . . .	170
3.3.6. Estudio de regresión y correlación . . . . .	170
3.3.7. Resumen de los resultados obtenidos en rata neonatal . . . . .	173
4. <u>Realimentación de ratas, neonatales y adultas, subnutridas desde la gestación</u> . . . . .	177
3.4.1. Realimentación de ratas neonatales subnutridas . . . . .	177
3.4.1.1. Peso, glucemia e insulinemia . . . . .	177
3.4.1.2. Niveles de IGF-I y II en suero . . . . .	177
3.4.1.3. Análisis de las IGFBPs en suero mediante "Western ligand blot" y "Western immunoblot" . . . . .	178
3.4.1.3.1. Cuantificación densitométrica . . . . .	178
3.4.2. Realimentación de ratas adultas subnutridas . . . . .	178
3.4.2.1. Peso, glucemia e insulinemia . . . . .	178
3.4.2.2. Niveles de IGF-I en suero . . . . .	183
3.4.2.3. Análisis de las IGFBPs en suero mediante "Western ligand blot" y "Western immunoblot" . . . . .	183
3.4.2.3.1. Cuantificación densitométrica . . . . .	183
3.4.2.4. Estudio de regresión lineal y correlación . . . . .	184
3.4.3. Resumen de los resultados obtenidos en los experimentos de realimentación . . . . .	189
3.5. <u>Tratamiento con insulina de ratas diabéticas, neonatales y adultas</u> . . . . .	189
3.5.1. Tratamiento con insulina de ratas diabéticas en periodo neonatal . . . . .	189
3.5.1.1. Peso, glucemia e insulinemia . . . . .	189
3.5.1.2. Niveles de IGF-I y II en suero . . . . .	190
3.5.1.3. Análisis de las IGFBPs en suero mediante "Western ligand blot" y "Western immunoblot" . . . . .	190
3.5.1.3.1. Cuantificación densitométrica . . . . .	191
3.5.2. Tratamiento con insulina de ratas adultas . . . . .	191
3.5.2.1. Peso, glucemia e insulinemia . . . . .	191
3.5.2.2. Niveles de IGF-I en suero . . . . .	196
3.5.2.3. Análisis de las IGFBPs en suero mediante "Western ligand blot" y "Western immunoblot" . . . . .	196
3.5.2.3.1. Cuantificación densitométrica . . . . .	197

3.5.2.4. Estudio de regresión lineal y correlación . . . . .	197
3.5.3. Resumen de los resultados obtenidos en los experimentos de tratamiento con insulina . . . . .	198
3.6. <u>Realimentación y tratamiento con insulina de ratas adultas subnutridas y diabéticas</u> . . . . .	205
3.6.1. Evolución del peso corporal . . . . .	205
3.6.2. Peso, glucemia e insulinemia . . . . .	206
3.6.3. Niveles de IGF-I en suero . . . . .	206
3.6.4. Análisis de las IGFBPs en suero . . . . .	211
3.6.4.1. "Western ligand blot" . . . . .	211
3.6.4.2. Análisis comparativo mediante "Western ligand blot" y "Western immunoblot" . . . . .	212
3.6.5. Estudio de regresión lineal y correlación . . . . .	212
3.6.6. Resumen de los resultados obtenidos en el experimento de realimentación y tratamiento con insulina . . . . .	213
4. <b>DISCUSION</b> . . . . .	218
4.1. <u>Evaluación de distintos métodos de separación de las IGFBPs del suero</u> . . . .	219
4.2. <u>Cambios en los IGFs y las IGFBPs en la gestación. Efectos de la subnutrición y la diabetes</u> . . . . .	223
4.2.1. Cambios en los IGFs en la rata gestante . . . . .	223
4.2.2. Cambios en las IGFBPs en la rata gestante . . . . .	224
4.2.3. Implicaciones fisiológicas . . . . .	228
4.3. <u>Subnutrición y diabetes en periodo fetal</u> . . . . .	229
4.3.1. Subnutrición y diabetes desde el día 16 de gestación . . . . .	230
4.3.1.1. Efectos de la subnutrición y la diabetes sobre los niveles de IGFs . . . .	230
4.3.1.2. Efectos de la subnutrición y la diabetes sobre las IGFBPs . . . . .	235
4.3.1.3. Efectos de la subnutrición y la diabetes sobre los receptores de IGFs . .	238
4.3.2. Subnutrición y diabetes desde el día 14 de gestación . . . . .	239
4.4. <u>Subnutrición y diabetes en etapa neonatal</u> . . . . .	240
4.4.1. Patrón ontogénico de los IGFs y las IGFBPs en la rata neonatal control . .	240
4.4.2. Efectos de la subnutrición y la diabetes	

sobre IGF-I y II en periodo neonatal . . . . .	243
4.4.3. Efectos de la subnutrición y la diabetes sobre las IGFBPs en periodo neonatal . . . . .	247
4.4.4. Efectos de la subnutrición y la diabetes sobre los receptores de IGF en periodo neonatal . . . . .	249
4.4.5. Interrelaciones entre IGF-I, IGFBP-30 kDa y crecimiento. Papel de la insulinemia y la glucemia . . . . .	251
4.5. <u>Efectos de la realimentación y el tratamiento sustitutivo con insulina</u> . . . . .	253
4.5.1. Efectos de la rehabilitación sobre el peso corporal, la glucemia, la insulinemia y los niveles de IGF-I en neonatos . . . . .	251
4.5.2. Efectos de la rehabilitación sobre el peso corporal, la glucemia, la insulinemia y los niveles de IGF-I en adultos . . . . .	252
4.5.3. Comentarios sobre el estado del tema en la bibliografía . . . . .	252
4.5.4. Efectos de la rehabilitación sobre las IGFBPs en neonatos y adultos . . . . .	253
4.5.5. rehabilitación de ratas adultas subnutridas y diabéticas . . . . .	254
4.5.6. Correlaciones establecidas en los experimentos de rehabilitación anteriormente reseñados . . . . .	256
<b>5. CONCLUSIONES</b> . . . . .	258
<b>6. BIBLIOGRAFIA</b> . . . . .	263

## ABREVIATURAS

AEC	Extracción en ácido-etanol con crioprecipitación.
ALS	Subunidad ácido-lábil ("acid-labile subunit).
ANOVA	Análisis de la varianza.
APS	Persulfato amónico.
B	Concentración de ligando unido a su receptor.
B <sub>0</sub>	Ligamiento específico.
BCIP	5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato
BPA	Radioanálisis de proteínas ligadoras ("binding protein assay").
BSA	Albúmina sérica bovina.
C	En un gel de poliacrilamida, relación (en tanto por ciento) entre el agente de reticulación (bisacrilamida) y la acrilamida en la solución acrilamida/bis.
DE	Desviación estándar.
ED <sub>50</sub>	Concentración de ligando frío capaz de desplazar el 50% de ligando marcado de su unión al receptor.
F	Concentración de ligando libre.
FA	Extracción en ácido fórmico-acetona.
FAM	Tampón fosfato con BSA y mertiolato sódico.
FG	Filtración en gel.
FPLC	Cromatografía líquida rápida de proteínas ("Fast protein liquid chromatography").

HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución ("High performance liquid chromatography").
IGF	Factor de crecimiento similar a la insulina ("Insulin-like growth factor"). Prefijos: r (rata), h (humano).
IGFBP	Proteína ligadora de IGF ("Insulin-like growth factor-binding protein"). Prefijos: r (rata), h (humano), b (bovino).
$K_a$	Constante de afinidad.
$K_d$	Constante de disociación.
$K_{av}$	Coeficiente de disponibilidad.
KRP	Tampón Krebs-Ringer-fosfato.
LBB	Tampón de "ligand blotting".
MSA	Actividad estimuladora de la multiplicación ("Multiplication-stimulating activity").
N	Ligamiento inespecífico.
NBT	Nitro azul de tetrazolio.
Nonidet-P40	Oxido de octilfenol-etileno.
NSILA	"Non-suppressible insulin-like activity".
P/AE/Tris	Mezcla PBS, ácido-etanol, Tris base.
PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida ("Polyacrylamide gel electrophoresis").
PBS	Tampón fosfato ("phosphate buffer saline").
PMSF	Fluoruro de fenil-metil-sulfonilo.
rhIGF	IGF humano recombinante



R <sub>f</sub>	Movilidad electroforética relativa.
RIA	Radioinmunoanálisis.
RRA	Radioanálisis de receptores ("radioreceptor assay").
SDS	Dodecilsulfato de sodio.
STZ	Estreptozotocina.
T	Concentración de ligando total. En un gel de poliacrilamida, tanto por ciento de monómero total (acrilamida más bisacrilamida) en la solución acrilamida/bis.
TBS	Solución salina tamponada con Tris ("Tris-buffered saline").
TCA	Acido tricloroacético.
TEMED	N,N,N',N'-tetrametil etilendiamina.
trIGF-I	Des(1-3)IGF-I (IGF-I truncado).
Tris	Tris (hidroximetil) aminometano.
Tween-20	Monolaurato de polioxoetilenosorbitano.
V	Volumen de elución de una determinada sustancia por filtración en gel.

## **1.INTRODUCCION**

## **1. INTRODUCCION**

### **1.1. Estructura y acciones biológicas de los IGFs y sus proteínas ligadoras**

#### **1.1.1. Visión de conjunto.**

Los factores de crecimiento similares a la insulina ("insulin-like growth factors") IGF-I y II son polipéptidos relacionados con la insulina en su estructura y efectos biológicos. Ambos se sintetizan en numerosos tejidos, tanto en etapa fetal como adulta, ejercen acciones locales (auto y paracrinas), así como endocrinas, y están implicados en los procesos de mitogénesis y diferenciación.

Los efectos biológicos de los IGFs están mediados por dos tipos de receptores específicos; el receptor tipo I está relacionado estructuralmente con el receptor de insulina y parece mediar la mayor parte de las acciones de los IGFs; el receptor tipo II posee una estructura completamente diferente a la del receptor tipo I y su papel fisiológico no se conoce con exactitud.

En la sangre, líquidos extracelulares y medios de cultivo los IGFs se presentan unidos a proteínas ligadoras específicas ("insulin-like growth factor-binding proteins", IGFBPs) que constituyen a su vez una familia de péptidos estructuralmente relacionados entre sí.

Estos tres elementos, IGFs, proteínas ligadoras y receptores constituyen lo que se conoce como sistema IGF.

#### **1.1.2. Los factores de crecimiento similares a insulina.**

##### **1.1.2.1. Introducción histórica.**

Tres líneas de investigación independientes, basadas en tres diferentes observaciones, condujeron al descubrimiento de los IGFs (1). En 1957 Salmon y Daughaday (2) observaron que el suero estimulaba la incorporación de <sup>35</sup>S en el cartílago incubado. El suero de ratas hipofisectomizadas carecía de esta actividad de sulfatación, la cual no se reconstituía con la adición de GH al medio de incubación, pero reaparecía tras la administración de GH a las ratas hipofisectomizadas. Estos autores postularon que la GH no estimula por sí misma los procesos de crecimiento *in vitro* e *in vivo*, sino que induce la formación de factores mediadores que denominaron inicialmente factores de sulfatación y posteriormente somatomedinas.

Tan pronto como se desarrolló el radioinmunoanálisis (RIA) para insulina se observó que el suero ejerce efectos insulinomiméticos sobre los tejidos diana de la insulina que son

mucho mayores de lo que cabría esperar en función del contenido de insulina del suero, y no son suprimidos por la adición de antisuero antiinsulina. Esta actividad fue denominada NSILA ("nonsuppressible insulin-like activity") por Froesch y cols. en 1963 (3).

Finalmente, en 1972 Pierson y Temin (4) extrajeron del suero una serie de factores que denominaron MSA ("multiplication-stimulating activity"), ya que añadidos al medio de cultivo estimulaban la división celular. Posteriormente hallaron que estos factores eran secretados al medio por hepatocitos de rata en cultivo, proporcionando así la primera prueba de que la MSA es producida por el hígado.

Trabajos posteriores llevaron a la conclusión de que estas tres actividades constituían un único grupo de sustancias cuya posterior caracterización por Rinderknecht y Humbel en 1978 (5, 6) reveló que consistían en dos péptidos, IGF-I e IGF-II (7)

#### **1.1.2.2. Estructura.**

Los dos primeros IGFs caracterizados fueron hIGF-I y II, aislados del plasma humano por Rinderknecht y Humbel (5, 6), como ya se ha indicado anteriormente. Ambos están constituidos por una sola cadena polipeptídica de 70 (IGF-I) y 67 (IGF-II) aminoácidos, con tres puentes disulfuro intracatenarios. Ambas moléculas presentan entre sí una homología del 62%. De manera análoga a la proinsulina, los IGFs constan de dominios A y B separados entre sí por un dominio C; los dominios A y B muestran una homología de aproximadamente el 45% con los dominios respectivos de la proinsulina, mientras que no hay relación estructural alguna en el dominio C. Además, los IGFs poseen una región D, extensión del extremo carboxiterminal, que no se presenta en la insulina (8).

Se ha conseguido determinar la estructura primaria de los IGFs de varias especies de mamíferos (9), comprobándose que las secuencias de ambos péptidos están altamente conservadas entre especies; las sustituciones son escasas y en su mayoría conservativas. El IGF-I humano, bovino y porcino son idénticos. El IGF-I de rata difiere del humano en 3 aminoácidos; fue aislado del suero de rata por Robin y cols. (10), y su secuencia completa se dedujo de la secuencia nucleotídica del gen por Shimatsu y Rotwein (11). El IGF-II de rata, inicialmente denominado MSA, fue aislado del medio condicionado de una línea celular de hepatocitos de rata (BRL-3A) por Marquardt y cols. (12), determinándose posteriormente su estructura primaria (12, 13), que muestra 4 sustituciones conservativas con respecto al péptido humano. El IGF-II muestra una variabilidad interespecífica en su secuencia algo mayor; las diferencias se concentran en la unión entre los dominios B y C, próximos a un sitio de empalme del mRNA (9).

Se ha señalado la presencia en suero humano de variantes de IGF-I e IGF-II (9, 14), como las variantes C33 (que se cree que representa una variación alélica) y B29 (que

parece surgir por empalme alternativo del precursor del mRNA correspondiente) de IGF-II (ambas son sustituciones de un aminoácido por un tri o tetrapéptido, respectivamente. Además de estas variantes se han descrito formas grandes de IGF-II, en concreto de 10 kDa y de 15 kDa, que parecen provenir del procesamiento parcial del dominio E (Ver más adelante). Normalmente estas formas grandes suponen menos del 10% del IGF-II total en suero humano, pero en pacientes con ciertos tumores grandes asociados con hipoglucemia pueden constituir hasta el 75% del IGF-II circulante (15). También se ha investigado la posible presencia en suero humano de formas grandes de IGF-I, habiéndose detectado proIGF-IA en el suero de pacientes urémicos, donde se concentra posiblemente por un deficiente aclaramiento (16). Se desconoce si proIGF-IB se acumula de manera análoga. Finalmente, se ha aislado del cerebro humano fetal y adulto, así como del calostro bovino, una forma de IGF-I que carece del tripéptido N-terminal (17). Esta forma truncada (trIGF-I) se cree que resulta de una modificación postraducciona de proIGF-I, ya que el punto de truncamiento no corresponde a una región de unión exón-intrón, ni se ha detectado un mRNA específico.

#### **1.1.2.3. Genes y precursores biosintéticos.**

Se ha conseguido caracterizar los genes de IGF-I y II tanto en humano como en rata. En ambas especies los genes comparten numerosos elementos estructurales, como la localización relativa de intrones y exones (9, 14, 18).

El gen de hIGF-I consta de 6 exones; los exones 3 y 4 codifican el péptido maduro; los exones 1 y 2 (precedidos cada uno por un promotor) así como los exones 5 y 6 aparecen en las diversas especies de mRNA de una forma mutuamente excluyente. El empalme alternativo de los exones 5 y 6 genera los precursores preproIGF-IB y A respectivamente. En la rata la organización de los exones es similar, pero los precursores se originan por empalme del exón 5 (preproIGF-IB) o de los exones 5 y 6 fusionados (preproIGF-IA), lo que explica la divergencia del precursor B entre especies (18).

El gen de hIGF-II consta de 9 exones, de los cuales son los exones 7, 8 y parte del 9 los que codifican el péptido maduro. El resto son exones no traducidos. Este gen está controlado por cuatro promotores cuya expresión depende del tejido y de la etapa del desarrollo. El gen de rIGF-II es homólogo al de hIGF-II, pero no se ha observado la expresión de los exones homólogos a los exones humanos 1 a 3, ni se ha documentado la existencia del promotor P<sub>1</sub> (18).

El proceso de transcripción de ambos genes es bastante complicado, tanto en humano como en rata. Mediante "Northern blot" de RNA poliadenilado se han identificado, en rata, numerosas especies de RNA en un rango de 0,7 a más de 7,0 kb para IGF-I y de 0,6 a 1,2 kb para IGF-II. Estas diferentes especies de mRNA se originan por diversos

mecanismos, como la activación diferencial de los promotores, empalme alternativo, distinto grado de poliadenilación y posterior procesamiento del mRNA. Todos estos mecanismos constituyen potenciales puntos de control de la estabilidad y capacidad de traducción de las especies de mRNA resultantes (9, 18).

El análisis de la secuencia nucleotídica de los genes de IGF-I y II efectuado en humano, rata y ratón ha permitido predecir los péptidos precursores de ambos IGFs. Se han identificado dos precursores de IGF-I denominados preproIGF-IA (153 residuos) y preproIGF-IB (195 residuos en humano; 158 en rata y ratón) que se originan a partir del gen de IGF-I por empalme alternativo (9). Estos péptidos incluyen, además de la secuencia del péptido maduro, un péptido señal y una secuencia o dominio E. Las secuencias de ambos precursores son muy similares entre especies; sólo el fragmento C-terminal (dominio E) del precursor IGF-IB diverge entre especies. Se conoce muy poco acerca de la biosíntesis y el procesamiento de estos precursores, pero algunos trabajos indican que ambos se traducen en proteínas. Se han aislado del medio condicionado de líneas celulares de fibroblastos humanos moléculas grandes de IGF-I cuya secuencia coincide con la predicha para proIGF-IA (19). Mediante el empleo de anticuerpos contra el dominio E de proIGF-IA se ha detectado la presencia de este precursor en el suero de pacientes urémicos, como se señaló en 1.1.2.2.

El precursor de IGF-II contiene 180 residuos, incluyendo péptido señal, péptido maduro y una secuencia E carboxiterminal de 89 residuos. La secuencia de este precursor está altamente conservada entre especies. Como se señaló en 1.1.2.2. se han detectado en suero, tanto normal como de pacientes con cierto tipo de tumores, formas de IGF-II de alto peso molecular provenientes del procesamiento parcial del dominio E. Igualmente se han identificado formas estables de 8,7 y 16 kDa en el medio condicionado de células BRL-3A (20) que presentan actividad biológica.

Parece, por tanto, que estas formas de mayor tamaño no son propéptidos inertes, sino que pueden desempeñar funciones específicas hasta ahora no caracterizadas. Se desconoce la función del dominio E carboxiterminal en los precursores de ambos péptidos, así como los pasos enzimáticos implicados en su procesamiento.

#### **1.1.2.4. Origen, síntesis, secreción y circulación.**

A diferencia de otras hormonas polipeptídicas, los IGFs no son sintetizados en células endocrinas especializadas, ni se almacenan en gránulos secretores cuyo contenido es vertido a la circulación cuando la célula endocrina recibe un estímulo adecuado (8). Los estudios sobre la distribución de mRNAs de IGF en tejidos de rata, ratón y humano han confirmado la idea de que ambos IGFs se sintetizan en múltiples órganos y tejidos. La mayoría de ellos producen ambos factores de crecimiento en algún momento del desarrollo

pre o postnatal, con la única excepción de las neuronas fetales en cultivo, que sólo producen IGF-I (14). No obstante, más del 90% del IGF total circulante es secretado por el hígado, como se deduce de experimentos efectuados en ese órgano aislado (21). Estos mismos experimentos han revelado que la secreción de IGF por el hígado perfundido es un proceso lento y continuo, paralelo a la secreción de albúmina.

Ambos IGFs, a diferencia de la insulina, circulan en la sangre unidos, prácticamente en su totalidad, a proteínas ligadoras específicas (las IGFBPs) formando dos complejos de ~ 150 y ~ 50 kDa. El primero de estos complejos contiene aproximadamente el 75% del IGF circulante en el individuo adulto. (Ver 1.1.3. para más detalle) Este hecho explica la vida media extremadamente alta de estos péptidos y la ausencia de variaciones circadianas en su concentración.

Se ha descrito la presencia de IGF-I, II o ambos en otros líquidos corporales, como orina, linfa, líquido cefalorraquídeo, líquido folicular, semen, saliva y leche. En todos ellos, a excepción de la saliva, los IGFs se presentan unidos a diversas formas de IGFBPs en proporción variable (14).

#### **1.1.2.5. Regulación de la producción.**

Aunque la distribución de los mRNAs de IGF-I y II es similar, su regulación es diferente. En la regulación de la síntesis y secreción de ambos péptidos concurren factores hormonales, factores específicos de tejido, factores relacionados con el desarrollo y factores nutricionales. Los dos últimos se tratan con más detalle en 1.2. y 1.3. respectivamente:

##### **1.1.2.5.1. Factores hormonales.**

En roedores la hormona de crecimiento (GH) es el principal regulador de la expresión de IGF-I en el adulto. Incrementa la transcripción y la abundancia de mRNA en la mayoría de los tejidos, no sólo en hígado. Tras la administración de GH se produce un rápido incremento en todas las especies de mRNA de IGF-I, aunque la magnitud del cambio varía con el tejido y la especie de mRNA (22). La dependencia de GH de los niveles circulantes de IGF-I en etapa postnatal está también ampliamente confirmada, tanto en rata como en humano (14).

Aunque la GH es el principal regulador de la síntesis de IGF-I y del crecimiento en etapa postnatal, parece tener poco o ningún efecto sobre el crecimiento fetal. En efecto, en fetos humanos anencefálicos, en experimentos de decapitación o hipofisectomía fetal y en casos de enanismo de Laron (carencia de receptores de GH) el peso al nacimiento es normal (23, 24). En estos casos por lo general la concentración de IGFs se ha hallado

normal. Se ha descartado también el lactógeno placentario (PL), una hormona estructuralmente relacionada con la GH, como regulador del crecimiento fetal. Si bien esta hormona posee acciones anabólicas sobre los tejidos fetales y puede estimular la síntesis de insulina e IGF-I por el páncreas fetal humano en cultivo tisular (25), en gestaciones que transcurren en ausencia de PL el peso al nacimiento no está alterado (26). Sí que podría intervenir el lactógeno placentario, junto con la GH placentaria (PGH) en el aumento de la concentración de IGF-I que se produce en la mujer a lo largo de la gestación (23).

Se cree que la insulina es un importante regulador de la síntesis de IGF durante la etapa fetal (27). La exposición a insulina provoca un incremento de la producción de IGF en hepatocitos de rata aislados (28), explantes de hígado en cultivo (29) e hígado de rata perfundido (30). Es interesante también la observación de que el páncreas fetal humano libera IGF-II siguiendo un patrón similar al de la insulina (31). La insulina se requiere también para la liberación de IGF-I inducida por GH, como indica la observación de que en pacientes con diabetes mellitus dependiente de insulina hay un bloqueo en la respuesta de IGF-I a GH administrada exógenamente (32) y el hecho de que la administración de insulina a animales diabéticos restablece los niveles de mRNA de IGF-I y de péptido circulante (33).

Además de la GH se han descrito otros reguladores hormonales de IGF-I, como los estrógenos en el útero (en rata), la prolactina ovina en el hígado y otros factores de crecimiento en fibroblastos humanos en cultivo (9). Se cree también que las hormonas tróficas, como ACTH, TSH, LH y FSH pueden, además de su acción clásica en la producción de hormonas secundarias, estimular la biosíntesis de IGF-I en sus órganos diana; los efectos promotores del crecimiento de estas hormonas están, pues, mediados por la estimulación de la producción local de IGF-I (17).

Los efectos del estado tiroideo sobre el axis GH-IGF-I son complejos, ya que las hormonas tiroideas actúan a distintos niveles, desde el control hipotalámico de la liberación de GH hasta la expresión tisular de IGF-I y sus proteínas ligadoras (34). Se ha comprobado en hígado de rata perfundido que dosis fisiológicas de  $T_3$  (pero no de  $T_4$ ) estimulan la síntesis y liberación de IGF-I (35). El hipotiroidismo se acompaña de bajos niveles de IGF-I y un descenso de la expresión de su gen. No se ha establecido si esto es debido a un efecto directo de las hormonas tiroideas sobre el gen de IGF-I o si es un efecto secundario mediado por el descenso de la secreción de GH, si bien las hormonas tiroideas por sí solas no parecen regular la expresión de este gen. En pacientes tirotoxicósicos se han encontrado niveles de IGF-I elevados o normales, pero su actividad biológica es baja, debido probablemente a cambios en las IGFBPs (34).

Los datos que se poseen sobre la regulación hormonal de IGF-II son fragmentarios y limitados a algunos tejidos. Por ejemplo, se ha demostrado regulación por FSH, hCG y



(Bu)<sub>2</sub>cAMP en células de la granulosa de ovario humano, y por ACTH y (Bu)<sub>2</sub>cAMP en células adrenales fetales humanas (17). No está claro, sin embargo, si esto representa un efecto específico sobre el mRNA de IGF-II o un efecto inespecífico sobre la viabilidad celular. Los escasos resultados sobre el papel de GH en la regulación de la expresión del gen de IGF-II no permiten concluir que haya una clara dependencia entre esta hormona y la síntesis de IGF-II, a diferencia de IGF-I.

Los glucocorticoides parecen intervenir en la regulación del mRNA de IGF-II en hígado postnatal, donde tienen un papel inhibitorio, como sugieren los experimentos de Beck y cols. (36), en los que se administró cortisona por vía intraperitoneal a ratas de 9 días de vida y se observó una pérdida acelerada de mRNA hepático de IGF-II 2 y 4 días después.

#### **1.1.2.5.2. Factores nutricionales. (Ver 1.3.)**

El estado nutricional interviene también en la regulación de la expresión del gen de IGF-I. Se ha observado un descenso de los niveles de IGF-I circulante y de mRNA hepático de IGF-I en situaciones de ayuno y restricción proteica (37, 38). Cambios similares se producen en modelos animales de diabetes por estreptozotocina (STZ), que pueden interpretarse como resultantes de una alteración del estado nutricional (39).

#### **1.1.2.5.3. Factores relacionados con el desarrollo. (Ver 1.2.)**

Los genes de ambos IGFs se expresan de acuerdo con un patrón de desarrollo característico. En la rata, durante la vida fetal y neonatal temprana se expresan ambos genes, aunque el mRNA de IGF-II es más abundante (9). En el adulto el mRNA de IGF-I se expresa en todos los tejidos, especialmente en el hígado; en cambio el mRNA de IGF-II es apenas detectable en todos los órganos salvo el cerebro (9). En el humano el patrón de expresión génica es similar, a excepción del hígado adulto, donde se expresa el gen de IGF-II. El patrón de dependencia de la edad de ambos IGFs en la circulación está bien establecido, tanto en el humano como en otras especies (14).

#### **1.1.2.5.4. Factores específicos de tejido.**

El mRNA de IGF-I se expresa en todos los tejidos analizados hasta ahora. De todos los órganos, es el hígado el que tiene los mayores niveles de mRNA de IGF-I, y, de hecho, constituye la mayor fuente de IGF-I circulante en la rata adulta (21). En todos los tejidos IGF-IA es la principal variante, mientras que IGF-IB es relativamente más abundante en hígado que en los demás tejidos. Además de las diferencias entre órganos, a su vez, dentro de cada órgano hay diferencias regionales o entre distintos tipos celulares en la abundancia de mRNA; por ejemplo, en el SNC la médula espinal cervicotorácica y

el bulbo olfatorio contienen 8 a 10 veces mayor cantidad que el cerebro (40); en riñón de rata se detecta 10 veces más mRNA de IGF-I en las células del túbulo colector que en otras partes de la nefrona (41).

Tanto en rata como en humano el gen de IGF-II se expresa a niveles altos en numerosos tejidos fetales y neonatales, además de la placenta. Hacia la tercera semana de vida postnatal se produce en la rata un descenso en todos los tejidos excepto cerebro y médula espinal (14). Los estudios de hibridación *in situ* localizan el mRNA cerebral de IGF-II en los plexos coroideos y las leptomeninges (42), lo que ha llevado a sugerir que el IGF-II sintetizado por los plexos coroideos es secretado al líquido cefalorraquídeo y captado por las células neuronales y gliales del cerebro (9). En humano, a diferencia de la rata, el mRNA de IGF-II se expresa también en muchos tejidos en el adulto, aunque a niveles considerablemente más bajos que en el feto (43).

Además de su producción en los tejidos normales, se ha comprobado la síntesis constitutiva de mRNA de IGF-II en varios tumores, algunos de los cuales sintetizan también mRNA de IGF-I (44). No está claro el papel de estos péptidos en el crecimiento o progresión tumorales, aunque se ha comprobado *in vitro* que algunas líneas tumorales son capaces de proliferar en medio libre de suero gracias a la acción auto/paracrina de IGFs (44).

#### **1.1.2.6. Acciones de los IGFs.**

La base de las propiedades biológicas de IGF-I y II reside en parte en su homología estructural con la insulina. No sorprende, por tanto, que IGF-I y II muestren cualitativamente las mismas acciones biológicas que la insulina (1). La asociación de los IGFs con proteínas ligadoras específicas es un factor esencial que determina sus acciones biológicas (Ver 1.1.2.7.), las cuales pueden resumirse en dos apartados, acciones *in vitro* y acciones *in vivo*.

##### **1.1.2.6.1. Acciones *in vitro*.**

Las acciones de los IGFs *in vitro* están bien establecidas en un amplio número de tipos celulares, y pueden resumirse en dos grandes apartados: acciones metabólicas insulinomiméticas, y acciones sobre el crecimiento y la diferenciación celular.

Ambos IGFs tienen efectos similares a los de la insulina en los tejidos diana típicos de esta hormona, como tejido adiposo y músculo, donde estimulan el transporte y metabolismo de glucosa y la síntesis de glucógeno y proteínas (1). Estos efectos son indistinguibles, cualitativamente, de los ejercidos por la insulina, si bien la potencia de los IGFs es menor (de 5 a 10 veces para el músculo y unas 100 veces para el tejido adiposo).

Aunque los IGFs parecen actuar a través del receptor de insulina en el tejido adiposo, las acciones en el músculo están mediadas a través del receptor tipo I (45).

Con el empleo de cultivos celulares primarios, líneas celulares establecidas o explantes de órganos se ha demostrado repetidamente que ambos IGFs estimulan la síntesis de DNA y la proliferación celular (1). Se ha sugerido que los IGFs actúan como factores de progresión, estimulando el paso de las células a la fase del ciclo celular de síntesis de DNA (fase S). Esta acción mitótica tiene lugar en conjunción con factores de competencia, como PDGF y FGF, que inician el ciclo celular y capacitan a las células para responder a los factores de progresión, pero se desconoce el mecanismo íntimo de este fenómeno (46). Como agentes mitogénicos los IGFs participan en el crecimiento del embrión, feto y neonato, y en fenómenos como la hipertrofia fisiológica o compensadora de determinados órganos, en la reparación de las heridas en nervio, músculo y células endoteliales, y la proliferación neoplásica (9).

Otro aspecto de las acciones de los IGFs *in vitro* a largo plazo es su efecto sobre la diferenciación celular. Este efecto es más pronunciado que el efecto estimulador de la multiplicación celular. Se ha demostrado que los IGFs estimulan la diferenciación de los mioblastos, osteoblastos y adipocitos, así como oligodendrocitos; intervienen en la diferenciación de la función testicular y ovárica (sinérgicamente con las gonadotropinas); inducen la eritropoyesis (sinérgicamente con la eritropoyetina), e IGF-I estimula la granulopoyesis y la quimiotaxis de las células endoteliales. Se ha descrito también que los IGFs estimulan el crecimiento de las neuritas (17).

En términos generales, los IGFs pueden considerarse hormonas anabólicas activas a lo largo de la vida. El resultado final de su acción dependerá de la capacidad de respuesta de sus tejidos diana. Si las células están en la fase hiperplásica entonces los IGFs estimularán la proliferación. En cambio, si las células están experimentando crecimiento hipertrófico o se trata de células maduras que no se dividen, como las neuronas, entonces se estimularán otros procesos anabólicos, como por ejemplo la síntesis proteica. (17)

#### **1.1.2.6.2. Acciones *in vivo*.**

Diversos estudios *in vivo* han permitido demostrar que los IGFs poseen tanto un efecto agudo insulinomimético como un efecto crónico promotor del crecimiento (47). Ambos efectos dependen del modo de administración: la inyección en forma de bolo causa los efectos agudos y las inyecciones subcutáneas a largo plazo causan los efectos crónicos. Esta diferencia tan marcada se explica por la distinta disponibilidad de IGFs por los tejidos, modulada por las IGFBPs (45): tras un bolo el péptido libre, en exceso con respecto al que se halla asociado a las IGFBPs, induce los efectos insulinomiméticos; tras

las inyecciones subcutáneas el péptido se asocia gradualmente a las IGFBPs, con lo que el animal queda protegido de los efectos metabólicos agudos.

Inyectados como bolo intravenoso los IGFs tienen un marcado efecto insulinomimético sobre la homeostasis y el metabolismo glucídico. Zapf y cols. (48) han demostrado que la administración de un bolo intravenoso de IGF-I o IGF-II a ratas normales o hipofisectomizadas induce hipoglucemia y aumenta la captación de glucosa del suero y su incorporación a glucógeno. En estos experimentos la estimulación de la lipogénesis fue escasa, y sólo se produjo en ratas normales. Resultados similares se han obtenido en otras especies, incluyendo el humano, con la administración de rhIGF-I (17). IGF-I es menos potente que la insulina en la inducción de hipoglucemia, aunque ambas hormonas provocan un aumento similar en la concentración de hormonas contrarreguladoras (49).

La administración subcutánea a largo plazo de rhIGF-I estimula el crecimiento de ratas hipofisectomizadas, ratas normales antes y después del destete, y ratas diabéticas (17). Sin embargo, la comparación del tratamiento de ratas hipofisectomizadas con GH y con IGF-I indica que GH es más potente promoviendo el crecimiento. Aunque el tratamiento con GH causa un aumento proporcionado del tamaño de los órganos, el tratamiento con IGF-I resulta en un incremento mayor en el peso de algunos órganos, como riñón, bazo y timo (50). Estas diferencias pueden ser debidas a diversos cambios en el perfil de las IGFBPs inducido por ambos tratamientos (GH, a diferencia de IGF-I, induce la aparición de complejos ternarios de 150 kDa) que a su vez pueden alterar el aporte de IGF a los distintos tejidos (51). No puede descartarse, sin embargo, que algunas acciones de GH estén mediadas por la estimulación de IGF-I producido localmente, en lugar de IGF-I circulante. Debe considerarse también que GH puede ejercer acciones directas sobre los tejidos, independientes de la inducción de IGF-I (9)

Numerosos estudios clínicos y de experimentación animal apuntan a una relación entre el crecimiento y los niveles de IGF-I. Los pacientes con acromegalia presentan niveles de IGF-I unas tres veces superiores a los de individuos sanos, al contrario de los pacientes con enanismo hipofisario (1). Las ratas portadoras de tumores secretores de GH presentan niveles elevados de IGF-I, y crecen con rapidez; tras la extracción del tumor los niveles de GH e IGF-I descienden, y el animal deja de crecer (52). En estas situaciones los niveles de IGF-I son paralelos a los de GH, por lo que no es posible discriminar si el responsable del crecimiento excesivo o reducido es GH o IGF-I. El caso de los pigmeos indica que es IGF-I la hormona directamente relacionada con el crecimiento (1). Su talla baja no se explica por factores nutricionales o ambientales, sino que es debida a que no sintetizan cantidades normales de IGF-I a pesar de contar con niveles adecuados de GH.

El papel de IGF-II *in vivo* no está resuelto todavía. IGF-II es menos dependiente de GH, y su potencia promoviendo el crecimiento es considerablemente menor que la de

IGF-I. Se ha señalado, sin embargo, que IGF-II puede participar en el desarrollo durante la etapa embrionaria y fetal (Ver 1.2.) Los experimentos de DeChiara y cols. (53) apoyan esta hipótesis: neonatos de ratones homocigóticos para una mutación del gen de IGF-II son de tamaño inferior al normal, aunque proporcionados. Se ha propuesto (14) que este péptido podría contribuir al crecimiento independiente de GH, puesto que sus concentraciones en niños con resistencia a GH son aproximadamente un 40% de las normales, y en niños con deficiencia de GH aproximadamente un 30%. En estos casos la velocidad de crecimiento está unas 3 desviaciones estándar por debajo de la media, pero no hay detención del crecimiento; el IGF-II residual podría regular significativamente el crecimiento independiente de GH. A favor de esta hipótesis está el hecho de que en la rata, especie en la que la expresión del gen de IGF-II cesa hacia la 3ª - 4ª semana de vida, la hipofisectomía provoca una detención casi completa del crecimiento (14). El predominio de IGF-II en cerebro y líquido cefalorraquídeo y la alta tasa de expresión de su gen en plexo coroideo, así como la presencia de receptores tipo I en diversas áreas del cerebro sugieren, finalmente, un posible papel de este péptido en el sistema nervioso central (9).

#### **1.1.2.6.3. Acciones autocrinas, paracrinas y endocrinas.**

En un principio se creyó que los IGFs eran factores de crecimiento sistémicos que actuaban como hormonas clásicas. Estudios posteriores mostraron que la mayoría de los tejidos sintetizan ambos IGFs en algún momento del desarrollo pre o postnatal (14), lo que sugiere que los IGFs poseen también un modo de acción paracrino y autocrino al secretarse al microambiente y estimular localmente el crecimiento celular. La importancia relativa de cada modo de acción varía de un tejido a otro y con la etapa de desarrollo. Las acciones auto/paracrinas son probablemente más importantes en tejidos en los que la expresión local del gen de IGF-I y las concentraciones tisulares de IGF-I son elevadas, como es el caso del pulmón, riñón y granulosa del ovario, y en aquellos órganos donde las barreras anatómicas limitan la entrada de IGFs desde la circulación, como el testículo y el sistema nervioso central (14). Las acciones auto y paracrinas pueden desempeñar un papel particularmente importante en la hipertrofia y reparación tisular local. Las acciones endocrinas, por otro lado, participarían en el crecimiento corporal global integrado (14).

En la etapa fetal se ha sugerido un papel predominante de las acciones auto/paracrinas sobre las endocrinas. En efecto, en el feto humano los genes de ambos IGFs se expresan en numerosos tejidos (54, 14), mientras que los niveles de IGFs circulantes son relativamente bajos. En la etapa postnatal existe la posibilidad de una interacción de las acciones auto/paracrinas y endocrinas de IGF-I, ya que tras el nacimiento se produce un incremento progresivo de los niveles circulantes de IGF-I junto con el número de receptores hepáticos de GH, a la vez que la expresión del gen de IGF-I queda limitada prácticamente sólo al hígado (14).

Se ha sugerido una base molecular para esta dualidad de acciones para IGF-I. LeRoith y Roberts (55) han descrito dos clases principales de transcritos del mRNA de IGF-I, identificadas en tejidos hepáticos y extrahepáticos, que codifican el mismo péptido maduro y que tienen su origen en el empleo de distintos sitios de iniciación de la transcripción en el exón 1 o 2. Los transcritos con exón 2 están regulados por GH y se cree que codifican la forma endocrina de IGF-I; los transcritos con exón 1, presentes en todos los tejidos examinados, están regulados por factores distintos de GH y podrían representar la forma auto/paracrina del péptido. Los mRNAs de las formas precursoras IA y IB también están regulados de manera distinta por GH y podrían representar otro nivel de control de la función auto/paracrina o endocrina (56). Finalmente, Sara y Hall (17) han propuesto que trIGF-I, que por su baja afinidad por las IGFBPs se halla fundamentalmente en los tejidos, es la forma local de IGF-I, mientras que el péptido completo representa la forma endocrina.

### **1.1.3. Proteínas ligadoras de IGF.**

Poco después del descubrimiento de IGF-I y II se observó que, a diferencia de la insulina, ambos péptidos circulan en el suero formando parte de complejos de alto peso molecular (57). A finales de los años 70 se demostró que los IGFs de la mayoría de los líquidos corporales y del medio condicionado de células en cultivo están unidos a proteínas, que se denominaron proteínas ligadoras de IGF ("insulin-like growth factor-binding proteins", IGFBPs).

#### **1.1.3.1. Estructura.**

En los últimos años se ha conseguido determinar la estructura primaria completa de seis formas de IGFBPs, tanto en humano como en rata, bien directamente, bien mediante el aislamiento de clones de cDNA (58). La comparación de las secuencias de estas seis IGFBPs demuestra que se trata de una familia de proteínas relacionadas. Se ha convenido en designar estas IGFBPs mediante la adición de un numeral para distinguir los distintos tipos y un prefijo de una letra para indicar la especie de la cual proceden (59, 60).

Tanto en rata como en humano las IGFBPs se sintetizan como prepéptidos de cadena única, con péptidos señal de 19 a 39 residuos. Las proteínas maduras tienen un tamaño similar (201 a 289 aminoácidos) y un peso molecular (deducido de su secuencia de aminoácidos) entre 21,5 y 31,4 kDa (61).

Se han reconocido tres regiones de tamaño similar en la estructura de las IGFBPs (61, 62): los extremos N y C-terminal y la región intermedia. Las secuencias de los extremos N y C-terminal están altamente conservadas entre los distintos tipos de IGFBPs, e incluyen 18 residuos de cisteína en las IGFBPs 1 a 5, 12 de ellos en la región N-terminal y 6 en

la región C-terminal. IGFBP-6 carece de 2 (en humano) o 4 (en rata) cisteínas N-terminales. Estas cisteínas participan en la formación de puentes disulfuro intrarregionales que, a juzgar por su conservación, parecen intervenir en la formación del sitio de unión a IGFs. Tanto IGFBP-1 como IGFBP-2 contienen una secuencia Arg-Gly-Asp (RGD) en su extremo C-terminal que constituye un sitio de unión potencial a receptores celulares (integrinas) de numerosas proteínas de la matriz extracelular.

La región intermedia de la molécula no está conservada entre las diferentes IGFBPs, aunque sí entre especies para cada IGFBP (61, 62); por ejemplo, hay un 80% de identidad entre la IGFBP-2 de rata, humano y bovino. Esta región contiene sitios potenciales de N-glicosilación en IGFBP-3 y 4 y dos residuos de cisteína adicionales en IGFBP-4; estos sitios de glicosilación se utilizan en ambas IGFBPs. IGFBP-6 presenta dos regiones potenciales de O-glicosilación en esta región y una más en la región C-terminal.

Han sido caracterizados también los genes de algunas de las IGFBPs (en concreto hIGFBP-1, 2 y 3 y rIGFBP-2) (58). Cada gen, presente como copia única, consta de cuatro exones; la localización de los límites intrón-exón está también conservada entre los genes de las distintas IGFBPs. El gen de IGFBP-3 contiene además un 5º exón que comprende secuencias no traducidas en 3'. La mayor parte del exón 1 codifica para el péptido señal y la región N-terminal; el resto del exón 1 y parte del exón 2 codifican para la región central; finalmente, el resto del exón 2 y los exones 3 y 4 codifican para la región C-terminal.

La organización y la regulación de los genes de esta familia de proteínas no están totalmente esclarecidas, y son actualmente objeto de intensa investigación.

#### **1.1.3.2. Propiedades de unión.**

Todos los miembros de la familia de las IGFBPs unen tanto IGF-I como IGF-II, y no unen insulina o proinsulina. Las constantes de afinidad aparentes ( $K_d$ ) se sitúan en un rango de 0,2 a  $1 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$ , comparables a las de la mayoría de los receptores de IGF (61, 62). IGFBP-1, 3 y 4 unen IGF-I y II con similar afinidad, mientras que IGFBP-2, 5 y 6 presentan menor afinidad por IGF-I que por IGF-II, sobre todo IGFBP-6. Observaciones recientes indican que la afinidad intrínseca de las IGFBPs por IGF-I puede ser modificada por la asociación de la IGFBP con la superficie celular o la matriz extracelular, o por fosforilación (63). Estas modificaciones constituyen un mecanismo potencial de regulación de las funciones biológicas de las IGFBPs.

La presencia de regiones altamente conservadas en todas las IGFBPs sugiere que contienen un dominio común de unión a IGF. Aunque los estudios de mutagénesis no proporcionan resultados concluyentes, sí puede asegurarse que la estructura tridimensional

de la molécula de IGFBP desempeña un papel importante en la unión de IGF (61); no está claro, sin embargo, si las IGFBPs comparten uno o más dominios específicos de unión a IGF. No se conoce tampoco qué regiones de la molécula de IGF están implicadas en la unión a las IGFBPs; en este aspecto los estudios son escasos.

#### **1.1.3.3. La subunidad ácido-lábil.**

La subunidad ácido-lábil ("acid-labile subunit", ALS) es una glicoproteína que, junto con IGFBP-3 e IGF-I o II en relación equimolar constituye el complejo ternario de 150 kDa, que en el individuo adulto porta la mayor parte del IGF circulante (Ver 1.1.3.4.). La ALS ha sido recientemente purificada y clonada (64). La secuencia predicha consta de 578 aminoácidos (precedida de una secuencia señal de 27 aminoácidos), con un peso molecular calculado de 63,3 kDa; presenta 7 sitios potenciales de glicosilación en Asn localizados principalmente junto a los extremos de la molécula.

La característica más llamativa de su estructura primaria es la alta proporción de residuos de Leu (22%), que forman 18 - 20 segmentos de 24 aminoácidos cada uno y que abarcan más de las tres cuartas partes centrales de la molécula. Segmentos similares se han encontrado en una gran variedad de proteínas, todas ellas implicadas en interacciones proteína-proteína que resultan en la formación de complejos, en la unión receptor-ligando o en la adhesión celular (64).

La ALS carece de efecto en la unión de IGF a IGFBP-3; en cambio, la unión de ALS a IGFBP-3 depende absolutamente de la presencia de IGF en el complejo, de modo que en ausencia de éste la unión es escasa o nula. Se ha comprobado que en IGFBP-3 la glicosilación no es imprescindible para unir IGF o formar complejos ternarios (65). La afinidad de la ALS por el complejo IGF:IGFBP-3 es dos órdenes de magnitud inferior a la de IGFBP-3 por IGF-I. No obstante, la ALS circula en exceso (2 o 3 veces) con respecto a los otros componentes del complejo, asegurando así que la mayor parte de la IGFBP-3 permanece en el complejo ternario (66).

La síntesis de ALS tiene lugar en el hígado (67, 64), y depende de la edad y de GH, de modo similar a lo que sucede con IGFBP-3, si bien la dependencia de GH parece ser directa (51) y no a través de IGF-I como en el caso de IGFBP-3.

#### **1.1.3.4. IGFBPs en suero y otros líquidos biológicos.**

Las IGFBPs en el suero son heterogéneas. El análisis mediante cromatografía en gel a pH neutro revela la presencia de dos regiones de distinto peso molecular: ~ 150 kDa y ~ 50 kDa (68). En el suero de individuos adultos, tanto humanos como de otras especies de mamíferos, la forma predominante es el complejo de 150 kDa, que porta la mayor parte



del IGF y que consta de IGF-I o II, IGFBP-3 y ALS en relación equimolar (69). Tanto IGFBP-3 como la ALS están altamente glicosiladas, de modo que aproximadamente el 20% de la masa del complejo la constituyen carbohidratos. El análisis de este complejo mediante "Western ligand blot" revela múltiples formas de IGFBP-3 (variantes de glicosilación entre 38 y 43 kDa y fragmentos glicosilados de 30 kDa), pero ningún otro tipo de IGFBPs (70).

La región de 50 kDa, que es predominante en etapas tempranas del desarrollo, contiene múltiples IGFBPs en distinta proporción. La aplicación de diversas técnicas ha permitido la identificación en esta región de todas las IGFBPs conocidas, tanto en suero humano (a excepción de IGFBP-6) como en suero de rata (61). Se cree que las IGFBPs de este complejo no están completamente saturadas de IGF, como sugiere la observación de que cuando se incubaba IGF marcado radiactivamente con plasma humano no fraccionado el radioligando se une rápidamente con preferencia a las IGFBPs de 50 kDa (71).

Se han hallado también diversas formas de IGFBPs en numerosos líquidos corporales (líquido cefalorraquídeo, líquido amniótico, linfa, líquido folicular, plasma seminal, leche, vítreo, orina), así como en el medio condicionado de numerosos cultivos celulares primarios y explantes de órganos (9, 61). En el líquido cefalorraquídeo, por ejemplo, la forma predominante, tanto en rata como en humano es IGFBP-2. En el líquido amniótico, sin embargo, IGFBP-1 es la forma predominante en humano, mientras que en la rata es IGFBP-2. En la leche de rata se ha demostrado la presencia de IGFBP-2, IGFBP-3 y una IGFBP de 24 kDa, y en la leche humana están presentes tanto el complejo de 50 kDa como el de 150 kDa. En la linfa humana el 93% del IGF total está presente en el complejo de 50 kDa, sin que se haya detectado el complejo de 150 kDa; por el contrario, en la linfa de rata parece haber complejos de 150 kDa. En otros líquidos extravasculares (líquido cefalorraquídeo, líquido amniótico, plasma seminal) no se han detectado ni ALS inmunorreactiva ni complejo ternario de 150 kDa (61).

#### **1.1.3.5. Expresión génica y regulación.**

La disponibilidad de clones de cDNA para las 6 distintas IGFBPs ha permitido abordar estudios sobre la distribución del mRNA en tejidos fundamentalmente humanos y de rata. Al igual que los IGFs, las diversas IGFBPs se sintetizan en múltiples órganos y tejidos, tanto en etapa fetal como postnatal (61, 58). En humano y en rata IGFBP-1 y 4 se expresan abundantemente en hígado adulto (72). IGFBP-1 abunda también en la decidua, donde su síntesis varía a lo largo del ciclo menstrual (73). IGFBP-2 abunda en cerebro (donde se localiza exclusivamente en plexos coroideos) y gónadas de rata adulta (74). IGFBP-3, por su parte, abunda en placenta, tanto de rata (75) como humana (76), y se expresa más abundantemente en riñón que en hígado (77). Los mRNAs de IGFBP-5 y 6 de rata son abundante sobre todo en riñón y pulmón, respectivamente (78). A su vez,

dentro de cada órgano la expresión del gen de una IGFBP concreta se circunscribe a determinados tipos celulares. Por ejemplo, en hígado el mRNA de IGFBP-3 se expresa sólo en células no parenquimatosas (77); en testículo el mRNA de IGFBP-2 se expresa en células peritubulares, pero no en células de Sertoli (79).

Al igual que en la regulación de los IGFs, en la regulación de las IGFBPs concurren factores hormonales y nutricionales, así como factores específicos de tejido y factores relacionados con el desarrollo. Estos últimos se tratarán con más detalle más adelante en esta introducción; en lo que sigue se tratará de hacer una somera revisión de los conocimientos actuales acerca de la expresión y la regulación de las diferentes formas de IGFBPs.

#### **1.1.3.5.1. IGFBP-1.**

IGFBP-1 fue el primer miembro de la familia de las IGFBPs en ser purificado (a partir del líquido amniótico humano) y caracterizado (80), aunque en un principio se conocía como proteína placentaria 12 o globulina  $\alpha 1$  asociada a la gestación (81). Circula a concentraciones más elevadas en la mujer que en el hombre, y sus niveles se incrementan notablemente durante la gestación. En el líquido amniótico se encuentra en concentraciones extremadamente altas, de origen supuestamente decidual (82).

En el suero humano IGFBP-1 muestra, a diferencia del resto de IGFBPs bien caracterizadas, un ritmo circadiano marcado que no depende del estatus secretor de GH (83) (aunque algunos estudios sugieren una dependencia inversa de esta hormona) (84), sino que está regulado metabólicamente. En efecto, los niveles de insulina *per se* y la disponibilidad de sustratos energéticos (en concreto carbohidratos) contribuyen notablemente a la regulación de la IGFBP-1 circulante (61, 68). Los niveles de IGFBP-1 circulante están elevados en el ayuno de corta duración, la diabetes mellitus de ambos tipos y el hipopituitarismo (85). Por el contrario, la realimentación, la ingesta de carbohidratos y la infusión de insulina durante el "clamp" de glucemia en pacientes con diabetes mellitus no dependiente de insulina se acompaña de un rápido descenso de los niveles de IGFBP-1 (86, 87). Los estudios con la técnica de "clamp", efectuados tanto en individuos sanos como en pacientes con diabetes mellitus insulino dependiente (87), indican que la insulina regula IGFBP-1 independientemente de la glucosa. Los estudios de perfusión muestran que la insulina acelera el paso transcapilar de IGFBP-1; este podría ser, por tanto, un mecanismo que contribuye a la capacidad de la insulina para reducir los niveles de IGFBP-1 circulante. Análogamente, IGFBP-1 está elevada en individuos con diabetes tipo 1 o 2 (87). Este patrón de regulación que se acaba de describir es similar al de las hormonas contrarreguladoras de la insulina, como el glucagón, lo que ha llevado a plantear la hipótesis de que la IGFBP-1 podría desempeñar un papel contrarregulador en el

mantenimiento de la homeostasis glucídica (88). Este papel podría estar relacionado con la capacidad de las IGFBPs de inhibir los efectos insulinomiméticos de los IGFs.

Una regulación similar ha sido descrita en la rata en estados catabólicos, como en hipofisectomía (89), ayuno (90) y diabetes (91). En las tres situaciones se ha descrito un incremento de los niveles hepáticos de mRNA de IGFBP-1. Aunque en las tres situaciones los niveles de insulina y GH son bajos, la evidencia sugiere que en la diabetes es la baja insulinemia la responsable del aumento del mRNA de IGFBP-1 (92), pero en el ayuno este aumento puede reflejar los bajos niveles de GH (90). No está claro, en cambio, si es GH o insulina el regulador primario tras la hipofisectomía (89). Diversos estudios *in vitro* sugieren, no obstante, un papel preponderante de la insulina en la regulación de IGFBP-1 en la rata (93, 94). Un mecanismo que puede contribuir al efecto de la insulina de reducir los niveles de IGFBP-1 en la circulación es el hecho de que esta hormona acelera el paso de IGFBP-1 a través de los capilares, y por consiguiente su aclaramiento, como indican los estudios de perfusión (95).

El papel de otras hormonas en la regulación de IGFBP-1 está menos estudiado. En la rata la inyección de dexametasona provoca un marcado incremento de la abundancia de mRNA hepático que se acompaña de un ligero incremento de la concentración de la proteína en suero (96). La elevada concentración de IGFBP-1 que se observa durante la gestación sugiere un papel de los estrógenos en la regulación de esta IGFBP. Aunque no se han observado cambios en la mujer a lo largo del ciclo menstrual, se ha descrito una elevación de sus niveles en niñas de talla elevada tratadas con etinilestradiol (81).

#### **1.1.3.5.2. IGFBP-2.**

La regulación de la IGFBP-2 circulante en humano no se conoce tan en profundidad como la de IGFBP-1 y 3. A diferencia de IGFBP-1, los niveles circulantes de IGFBP-2 son menos sensibles a los cambios metabólicos agudos. Tampoco muestran variaciones a lo largo del día o tras un ayuno nocturno (69). Se ha observado un aumento en los niveles de IGFBP-2 en suero de pacientes con deficiencia de GH o con enanismo de Laron (ausencia de receptores de GH) (97). En pacientes con hipoglucemia por tumor de células no insulares y en individuos normales a los que se ha infundido IGF-I, situaciones ambas caracterizadas por altas concentraciones de IGF-I y supresión de GH e insulina también estaba elevada IGFBP-2 (70). En cambio, ni la infusión de GH (que incrementa los niveles de IGF-I e insulina) ni la infusión combinada de GH e IGF-I a sujetos normales inducen IGFBP-2 (70). Otra serie de experimentos, en cambio, sugieren que la insulina es un candidato más probable para la regulación de IGFBP-2 en humano que IGF-I o GH: la infusión de IGF-I no provocó un aumento de IGFBP-2 cuando se "clampó" la glucemia (manteniendo la insulina constante), pero sí cuando se infundió sin "clampar" la glucosa (permitiendo el descenso de los niveles de insulina) (98).

Los estudios efectuados en la rata sugieren que la insulina es el principal regulador metabólico de IGFBP-2 (61), aunque la información que se posee es fragmentaria y en algunos casos controvertida. El mRNA de IGFBP-2 está aumentado en el hígado de rata diabética a pesar de los bajos niveles de IGF-I, y desciende tras tratamiento con insulina, pero no con IGF-I (99) (a pesar de que IGFBP-3 se restablece parcialmente). Aunque las alteraciones metabólicas de la diabetes pueden enmascarar una regulación potencial por IGF-I, este dato apoya más la interpretación de que en la rata IGFBP-2 está regulada inversamente por insulina. Se ha observado que los niveles altos de IGF-I (por infusión o en ratones transgénicos que sobreproducen esta hormona) (100) producen también un aumento del mRNA de IGFBP-2, pero se asocian a un descenso de la insulina, por lo que para excluir una posible regulación positiva por IGF-I serían necesarios estudios con "clamp" insulínico.

Se ha observado también un aumento en el mRNA hepático de IGFBP-2 en ratas sometidas a ayuno de 48 horas (92, 101) y a restricción dietética (tanto proteica como energética) (102, 103). La realimentación revierte los cambios en el mRNA de esta IGFBP en ratas ayunadas (92). Estos cambios se han querido explicar también como un efecto de los bajos niveles de insulina presentes en estos animales (61).

Por último, experimentos en ratas hipofisectomizadas (en las que el mRNA hepático de IGFBP-2 y la IGFBP-2 circulante están elevados) a las que se administró GH sugieren que la expresión de IGFBP-2 en hígado no está regulada directamente por GH (92).

#### **1.1.3.5.3. IGFBP-3.**

IGFBP-3 es la más abundante de las IGFBPs circulantes en el adulto. En el suero humano alcanza niveles al menos 10 veces superiores a los de otras IGFBPs para las que se dispone de análisis cuantitativo (68); en etapas tempranas del desarrollo, en cambio, su importancia relativa es menor. Los niveles séricos de esta IGFBP, así como los de la ALS, muestran un patrón de dependencia con la edad similar al de IGF-I, siendo más bajos en neonatos (en lactantes sus niveles son similares a los de otras IGFBPs) y aumentando progresivamente en etapa infantil para alcanzar un máximo durante la pubertad y decaer lentamente a lo largo de la etapa adulta (66, 104). Un patrón de desarrollo similar se ha descrito en el suero de rata (105). A diferencia de IGFBP-1, IGFBP-3 muestra escasas variaciones a lo largo del día (66).

El principal regulador hormonal de IGFBP-3, y por consiguiente del complejo ternario, es GH, como parece demostrar el hecho de que sus niveles son bajos en la deficiencia de GH y elevados en la acromegalia (69). De hecho, se ha propuesto la medición de IGFBP-3 como herramienta en el diagnóstico y seguimiento de la deficiencia

de GH, especialmente en niños, con ventajas sobre la determinación de IGF-I (106). Estudios en animales (administración de GH o IGF-I a ratas hipofisectomizadas, expresión de IGF-I en ratones transgénicos deficientes en GH) (51, 100) indican, sin embargo, que mientras que GH regula los niveles de ALS, IGF-I es el regulador primario de la IGFBP-3 circulante, estimada mediante "Western ligand blot". Por el contrario, las mediciones mediante RIA indican que el tratamiento de humanos sanos con IGF-I provoca un descenso significativo de los niveles de IGFBP-3 y ALS. La discrepancia se debe probablemente a diferencias de especie o metodológicas, aunque debe considerarse también la contribución de la síntesis y regulación de la IGFBP-3 extrahepática. (61, 68)

Tanto el ayuno prolongado (aunque no el de corta duración) como la restricción proteica provocan una reducción de los niveles séricos de IGFBP-3, que tienden a revertir con un aporte energético normal y con la administración de GH o IGF-I (107). Sin embargo, esta IGFBP no se ve alterada por los cambios agudos en la ingesta de nutrientes (66). Un descenso similar en los niveles de IGFBP-3 se ha descrito en la diabetes mal controlada (en humano) y en la diabetes provocada en la rata por la administración de STZ (66).

Recientemente se ha descrito en el suero de mujer (y otras especies, entre ellas la rata) gestante la presencia de actividad proteolítica que actúa sobre la IGFBP-3 endógena y reduce su capacidad para ligar IGFs radioyodados y es capaz también de degradar IGFBP-3 exógena radioyodada (108, 109). Una actividad proteolítica similar, aunque no necesariamente idéntica, ha sido observada en pacientes con enfermedades graves, tras cirugía mayor y en otras situaciones (68). El mecanismo bioquímico de las alteraciones proteolíticas de IGFBP-3 no está esclarecido, debido en parte a que la enzima o enzimas implicadas no han sido identificadas aún. Las consecuencias fisiológicas de este hecho son materia de especulación; se cree que la proteólisis de IGFBP-3 podría a su vez regular las acciones locales de IGF aumentando su disponibilidad por los tejidos (110).

#### **1.1.3.5.4. IGFBP-4, 5 y 6.**

El papel fisiológico de estas tres formas de IGFBP es muy poco conocido. IGFBP-4 se identifica fácilmente mediante "Western ligand blot" gracias a su movilidad electroforética característica (migra con pesos moleculares aparentes de 24 o 30 kDa, siendo esta última una variante N-glicosilada) (111). Un estudio reciente describe un aumento considerable de esta IGFBP en mujeres de edad con fracturas, y alta correlación con los niveles de PTH (112), lo que sugiere una conexión entre PTH elevada y función osteoblástica disminuida en la osteoporosis relacionada con la edad, ya que se sabe que IGFBP-4 inhibe la actividad osteoblástica estimulada por IGF. Sin embargo, puesto que otros tipos celulares también secretan IGFBP-4, se desconoce la contribución relativa de los diversos tejidos a los niveles circulantes de esta IGFBP.

No se ha descrito la presencia de IGFBP-5 en el suero humano, aunque sí en suero de rata (adulto), de donde se ha purificado (113). Los conocimientos acerca de esta IGFBP son escasos, debido a lo reciente de su descubrimiento y a la falta de un procedimiento para su determinación. Experimentos *in vitro* muestran una inducción de IGFBP-5 por IGF-I en fibroblastos humanos, mioblastos de ratón y células FRTL5 (de tiroides de rata) (61).

Al igual que IGFBP-5, lo reciente de su descubrimiento hace que los conocimientos que se poseen acerca de IGFBP-6 sean escasos. Sin embargo, la puesta a punto de un RIA específico de hIGFBP-6 (114) ha permitido la determinación de sus niveles en suero, comprobándose que éstos son significativamente más elevados en el varón que en la mujer. En pacientes acromegálicos los niveles son aproximadamente un 50% de los que presentan los individuos sanos, lo que parece sugerir una regulación inversa por GH. Finalmente, se ha detectado la presencia de IGFBP-6 en el líquido amniótico, donde su concentración es similar a la del suero (114).

#### **1.1.3.6. Papel biológico.**

Numerosas observaciones *in vivo* e *in vitro* otorgan a las IGFBPs un papel crucial en la regulación de la biodisponibilidad, y por tanto de las acciones biológicas, de los IGFs. La mayor parte (aproximadamente el 75%) del IGF total circula formando parte del complejo ternario de 150 kDa; el resto circula en la fracción de 50 kDa (Ver 1.1.3.4.). El complejo de 150 kDa, incapaz de atravesar la barrera capilar (a diferencia de la fracción de 50 kDa), protege los IGFs de la degradación enzimática y el rápido aclaramiento de la circulación, lo que trae como consecuencia una prolongación de la semivida de los IGFs circulantes (48, 115). La inyección en ratas de trIGF-I (que muestra muy baja afinidad por las IGFBPs) marcado radiativamente resulta en un mayor aclaramiento y en una mayor captación por los tejidos, en comparación con IGF-I y II, lo que sugiere que las IGFBPs restringen la transferencia de IGFs de la sangre a los tejidos mediante el control de sus tasas de aclaramiento de la circulación (116). En humano la semivida del complejo de 150 kDa es de 14 a 18 horas, en contraste con los 30 minutos del complejo de 50 kDa y los 12 minutos del péptido libre (110); en rata se han obtenido resultados similares (48). Una consecuencia de este hecho es la elevada concentración de IGFs en la circulación, unas 100 a 1000 veces superior a la de la mayoría de las hormonas peptídicas; las IGFBPs constituyen, pues, un reservorio de hormona activa. Otra importante consecuencia es la escasa variación diurna de los niveles de IGF en la circulación, que dependen más de los niveles de IGFBPs que de su tasa de síntesis; las IGFBPs actúan por lo tanto como "tampón", previniendo los efectos metabólicos agudos de los IGFs (Ver 1.1.2.6.2.).

Se admite que las IGFBPs son reguladores importantes de la acción de IGF sobre sus células diana. En condiciones experimentales apropiadas determinadas IGFBPs pueden inhibir o potenciar las acciones de IGF. El efecto predominante que resulta de añadir IGFBP-1 a 6 purificadas a células *in vitro* es la inhibición de la actividad biológica de los IGFs endógenos o exógenos (61). En algunos casos se ha comprobado que la inhibición resulta de la formación de complejos IGF:IGFBP incapaces de unirse a receptores de IGF o insulina (9). Para que se produzca un efecto inhibitorio puede ser necesario que la IGFBP esté presente en exceso o a concentraciones estequiométricas o en una forma particular (como IGFBP-1 fosforilada). La terminación de este efecto inhibitorio requiere posiblemente la disociación de los IGFs del complejo inactivo IGF:IGFBP por acción de masas, proteólisis u otros mecanismos. A este respecto se ha descrito (117) que la plasmina libera IGFs de complejos con IGFBP-1 de manera selectiva, por lo que pudiera tratarse de una proteasa de IGFBP con importancia fisiológica.

Los efectos de las IGFBPs como potenciadores de las acciones de IGF se han estudiado fundamentalmente en IGFBP-1 (*in vitro*) y 3 (*in vitro* e *in vivo*). El mecanismo exacto a través del cual IGFBP-1 potencia los efectos de IGF-1 no está aclarado, pero en él parece estar implicada la unión de ambos al receptor (118). Es posible que IGFBP-1 ayude a localizar el IGF en la proximidad del receptor mediante la asociación de esta proteína ligadora a la superficie celular (posiblemente a través de su secuencia RGD); la desfosforilación de IGFBP-1 favorecería entonces la liberación de IGF activo del complejo (61). En efecto, se ha comprobado que la IGFBP-1 no fosforilada tiene una afinidad por IGF-I de 4 a 6 veces menor que la forma no fosforilada (63).

Los efectos de IGFBP-3 como potenciador de las acciones biológicas de IGF-I son menores que los observados con IGFBP-1. En el mecanismo responsable de este fenómeno parece estar implicada la asociación de IGFBP-3 a la superficie celular, lo que, al igual que sucedía con IGFBP-1, aproximaría el IGF-I a su receptor (61). La reducción de la afinidad de IGFBP-3 por IGF-I que se produce tras la asociación de esta IGFBP a la superficie celular (119) permitiría la liberación lenta y continuada de IGFs del complejo IGF:IGFBP-3. No se conoce el mecanismo de esta alteración en la afinidad de IGFBP-3, pero podrían estar implicados desfosforilación, proteólisis, el efecto de proteoglicanos o todos ellos.

Trabajos recientes (120, 121) sugieren que las IGFBPs pueden poseer funciones intrínsecas, interaccionando con la célula de manera directa e independiente de su unión a IGF. Así, por ejemplo, se ha descrito la inhibición de la esteroidogénesis en células de la granulosa por IGFBPs (121); el efecto de las IGFBPs parece ser el resultado de la combinación de secuestro de IGF producido endógenamente y de interacción directa con la célula, con distintos dominios estructurales para el reconocimiento de IGF y la actividad biológica.

En resumen, la función primordial de las IGFBPs es distribuir los IGFs por diversos líquidos corporales y tejidos y regular su unión a los receptores (61, 62, 122). El control de la síntesis y secreción de las IGFBPs constituye un mecanismo de control local de la proliferación celular y de la regulación de la respuesta a IGF. El efecto regulador neto de las IGFBPs *in vivo* vendría determinado por el tipo de IGFBPs sintetizadas por una célula particular o sus vecinas y por las IGFBPs que penetran en el espacio extracelular provenientes de la circulación y se localizan en un tejido y tipo celular determinado. Las variaciones en la estructura terciaria de estas proteínas parecen desempeñar un papel destacado en los mecanismos de regulación de las funciones de las IGFBPs. En este sentido la acción de diversas proteasas puede modificar el tamaño molecular de las IGFBPs, alterar su movilidad transcapilar y regular por tanto la vida media y el metabolismo del IGF circulante. Además diversas modificaciones de las IGFBPs, como la glicosilación y la fosforilación pueden alterar su afinidad por IGF, permitiéndoles regular la unión de IGF a sus receptores. El equilibrio dinámico entre las IGFBPs solubles y unidas a la superficie celular constituiría un mecanismo de distribución de IGF entre las células (62).

#### **1.1.4. Receptores de IGF.**

Los IGFs ejercen sus acciones biológicas mediante la interacción con receptores específicos de la membrana celular. Experimentos de ligamiento competitivo, estudios de "affinity cross-linking" y, finalmente, la purificación y clonación del cDNA de los receptores ha permitido la identificación y caracterización de dos tipos de receptores, denominados receptor tipo I (o receptor de IGF-I) y receptor tipo II (receptor de IGF-II o, más recientemente, receptor de IGF-II/manosa-6-fosfato).

##### **1.1.4.1. Estructura.**

###### **1.1.4.1.1. Receptor tipo I.**

El receptor tipo I está relacionado estructural y funcionalmente con el receptor de insulina (123). Es una glicoproteína de estructura tetramérica que consta de dos subunidades  $\alpha$  extracelulares y dos subunidades  $\beta$  transmembranas unidas por puentes disulfuro intercatenarios. La subunidad  $\alpha$  (~ 130 kDa) contiene el dominio de unión al ligando. La subunidad  $\beta$  (~ 90 kDa) consta de un dominio hidrofóbico que atraviesa la membrana, un sitio de unión a ATP y sitios de autofosforilación; en esta subunidad se encuentra también la actividad tirosina-quinasa activada por ligando (123).

A partir del cDNA del receptor tipo I humano (124) se ha deducido la secuencia primaria de este receptor. Consta de un péptido señal de 30 aminoácidos y un precursor



de 1337 aminoácidos con una subunidad  $\alpha$  y otra  $\beta$  contiguas, separadas por una secuencia de escisión enzimática. Este precursor es glicosilado, dimerizado y procesado proteolíticamente para dar finalmente el complejo maduro. Las regiones C-terminal de la subunidad  $\alpha$  y N-terminal de la subunidad  $\beta$  son las que menor homología muestran con las del receptor de insulina. En cambio, la similitud más pronunciada se da en el dominio tirosina-quinasa (84% de identidad).

Diversos trabajos de ligamiento y de reactividad con anticuerpos antirreceptor sugieren la existencia de heterogeneidad en el receptor. No está claro, sin embargo, si estas formas heterogéneas del receptor tipo I representan productos de traducción de diferentes mRNAs o modificaciones postraduccionales, incluyendo glicosilación y grado de formación de puentes disulfuro (9, 45).

El empleo de técnicas de "affinity cross-linking" ha permitido demostrar la presencia de un subtipo de receptor tipo I en membranas de cerebro de rata y de humano (receptor tipo I neuronal) (125). Este subtipo de receptor se caracteriza por poseer una subunidad  $\alpha$  de menor peso molecular debido a diferencias de glicosilación. El significado funcional de esta variante de receptor se ha sugerido que guarda relación con la mayor abundancia de trIGF-I en el sistema nervioso central (17).

#### **1.1.4.1.2. Receptor tipo II.**

El receptor tipo II es una glicoproteína integral de membrana con un peso molecular de 250 kDa (45, 126). Este receptor une ligandos que contienen residuos de manosa-6-fosfato (Man-6-P) sin requerir para ello cationes divalentes, de ahí la denominación de receptor de Man-6-P independiente de cationes (CI-MPR). Se ha descrito también la existencia de un receptor de Man-6-P que en algunas especies requiere cationes divalentes para la óptima unión del ligando; se trata de una glicoproteína integral de membrana de unos 46 kDa. Ambos receptores han sido clonados en varias especies, entre ellas el hombre y la rata, constatándose que son proteínas relacionadas estructuralmente (126).

El receptor tipo II consta de 3 dominios estructurales, además de una secuencia señal (126). El dominio extracelular constituye el 92% de toda la secuencia; tiene una estructura repetitiva consistente en 15 segmentos contiguos homólogos entre sí que comparten un patrón altamente conservado de 8 residuos de cisteína. Este dominio contiene 19 sitios potenciales de N-glicosilación, algunos de los cuales son utilizados para dar un receptor maduro de 275-300 kDa. El receptor contiene también un región transmembranosa simple y un dominio citoplasmático que contiene cuatro regiones cuyas secuencias, altamente conservadas entre especies, son sustratos potenciales de varias proteína-quinasa. Se sabe que el receptor se fosforila en varios de estos sitios; carece, en cambio, de actividad autoquinasa (127).

Una forma modificada de este receptor está presente en la circulación de varias especies, entre ellas el humano y la rata (128-130). Tiene un peso molecular ligeramente menor que el de la forma membranosa, y se cree que procede de esta por escisión enzimática, si bien no puede descartarse la posibilidad de que exista biosíntesis de receptor soluble por procesamiento alternativo de su mRNA. Se cree que representa un paso en la vía degradativa del receptor, sin que se haya descartado un posible papel como proteína sérica ligadora de IGF-II y polipéptidos portadores de Man-6-P (especialmente en la rata fetal y en la oveja) (9, 131).

#### **1.1.4.2. Propiedades de unión.**

En la mayoría de las células coexisten los receptores tipo I y II y, en muchas células, hay además receptores de insulina (45). Por tanto, en los experimentos de ligamiento o "cross-linking" IGF-I o II marcados radiactivamente se distribuyen entre los diferentes tipos de receptores de acuerdo con sus concentraciones y afinidades, razón por la cual una estimación exacta de la afinidad de cada uno de los ligandos por los tres receptores no es posible con estas técnicas. A ello hay que añadir que las preparaciones de IGF-I y II empleadas en los primeros trabajos generalmente no estaban exentas de contaminación cruzada de ambos polipéptidos. No obstante la mayoría de los autores admiten el siguiente esquema de afinidades relativas en la mayor parte de los tejidos (123, 131): el receptor tipo I tiene mayor afinidad por IGF-I que por IGF-II, y une también insulina a altas concentraciones; el receptor tipo II tiene alta afinidad por IGF-II, no une insulina, y en varios tejidos y tipos celulares une IGF-I con baja afinidad; por último, la afinidad del receptor de insulina por los IGFs es unas cien veces más baja que la afinidad por insulina. Actualmente se dispone de herramientas para determinar con precisión las constantes de afinidad empleando IGFs recombinantes como ligandos y células que sobreexpresan algún tipo de receptor (132). El receptor tipo I de placenta humana transfectado a células CHO (de ovario de hámster chino) presenta una afinidad por IGF-II sólo 2 a 3 veces más baja que por IGF-I (para el que  $K_d = 1,5 \times 10^{-9}$  M) y reconoce débilmente insulina ( $K_d = 10^{-7}$  M).

Poco después de la identificación del receptor tipo II con el receptor de Man-6-P independiente de cationes se comprobó que este receptor une IGF-II y Man-6-P en sitios distintos. Existe controversia acerca de si la unión de ambos ligandos es independiente o si la unión de uno altera la afinidad del otro (126). Las enzimas lisosómicas, por ejemplo, impiden la unión de IGF-II, y a su vez IGF-II impide la unión de las enzimas lisosómicas, sin que esté claro el significado de este efecto. Curiosamente, los receptores tipo II de pollo y rana carecen del sitio de unión de IGF-II de alta afinidad, lo que sugiere que este sitio ha aparecido más tarde en la escala evolutiva (133).

### 1.1.4.3. Transducción de señales.

La actividad tirosina-quinasa intrínseca del receptor tipo I interviene en la mediación de las acciones biológicas de IGF-I a través de la fosforilación de sustratos celulares endógenos (123). La unión del ligando a la subunidad  $\alpha$  del receptor activa la tirosina-quinasa de la subunidad  $\beta$ ; sin embargo, no está claro aún el mecanismo molecular de la transducción de señales por la actividad quinasa. Se sabe que tras la estimulación de la quinasa del receptor tipo I se activan varias serina-quinazas, por lo que se ha sugerido que de la unión del ligando al receptor tipo I resulta una serie de serina-quinazas que actúan en una o más cascadas y que a su vez podrían intervenir en la regulación del propio receptor. Una de estas vías sería la fosforilación de serina-quinazas en residuos de Tyr (131). Se han identificado varios sustratos celulares endógenos de la quinasa del receptor tipo I. Uno de ellos es la proteína IRS-1 ("insulin receptor substrate-1"), anteriormente denominada fosfoproteína pp185, que es también sustrato endógeno del receptor de insulina. Esta proteína, una vez fosforilada, se asocia con diversas proteínas celulares, como la fosfatidilinositol 3-quinasa (134). Aunque las funciones específicas de estos sustratos endógenos fosforilados se desconocen, se están acumulando datos que sugieren que pueden ser importantes mediadores de la actividad biológica de los receptores tipo I y de insulina (135).

La agregación o la fosforilación cruzada de receptores pueden estar también implicadas en la transducción de señales (131). Esta fosforilación cruzada no sólo se da entre subunidades  $\beta$  del mismo receptor, sino también entre subunidades  $\beta$  de otros receptores tipo I y de receptores de insulina. No se sabe con certeza si esta fosforilación cruzada implica la formación de heterorreceptores unidos por puentes disulfuro. Esto podría explicar la existencia de respuestas celulares similares a IGF-I e insulina incluso si las vías de señalización de las quinazas de los receptores respectivos fueran diferentes. Estudios con receptores quiméricos, constituidos por el dominio extracelular del receptor de insulina y el dominio intracelular del receptor tipo I, o viceversa, indican que ambos receptores tienen mecanismos de señalización similares, aunque diferentes, definidos por el dominio citoplasmático (131, 135).

Si bien el papel del receptor tipo II en la distribución de enzimas lisosómicas está bien establecido (136), ha sido más difícil establecer un papel de este receptor en la transducción de señales, ya que IGF-II se une también al receptor tipo I y al receptor de insulina. De hecho, se ha comprobado que algunos de los efectos de IGF-II en varios tipos celulares están mediados por su unión al receptor tipo I o al receptor de insulina (131). No obstante, varios trabajos indican que IGF-II media respuesta a través de su propio receptor, como la estimulación de la síntesis de glucógeno en células de hepatoma de rata, la estimulación de la captación de aminoácidos en mioblastos humanos o el crecimiento y

desarrollo del metanefros de la rata (126). El mecanismo de transducción de señales se está empezando a dilucidar: se cree que los efectos de IGF-II están mediados por un mecanismo que implica el acoplamiento a una proteína G (en concreto  $G_{i-2\alpha}$ ) en el que parece intervenir un segmento de 14 aminoácidos del dominio intracelular del receptor (137). Queda por definir el papel de esta proteína G en el mecanismo de señalización de las acciones de IGF-II a través del receptor tipo II.

#### **1.1.4.4. Regulación.**

El receptor tipo I se regula en función de su grado de ocupación, y experimenta "down-regulation" por ambos IGFs y por insulina de manera proporcional a su potencia relativa de reactividad cruzada (123). Sin embargo, no se ha determinado aún el sitio de regulación durante el reciclaje del receptor. El número de receptores también está regulado por el estado nutricional (Ver 1.3.4.) y el momento del desarrollo (Ver 1.2.3.3.).

A diferencia del receptor tipo I, el receptor tipo II no experimenta "down-regulation" por ligando, sino que recircula continuamente entre la superficie celular y los compartimentos intracelulares a una tasa que no depende de su unión a IGF-II o a enzimas lisosómicas (9). Los efectos más marcados en la distribución del receptor tipo II se han observado en adipocitos y en células de hepatoma H-35. En ambas la insulina, a través de su receptor, provoca una redistribución de los receptores tipo II, que pasan del "pool" intracelular a la membrana plasmática, lo que resulta en un aumento del número de receptores tipo II en ésta sin que varíe su afinidad por IGF-II (123). Este efecto se asocia con un descenso generalizado de la fosforilación en serina y treonina de las moléculas de receptor presentes en la membrana plasmática. Otros agentes se ha comprobado que alteran también la distribución celular de receptores tipo II, aunque los efectos dependen del tipo celular estudiado. Por ejemplo, en fibroblastos humanos IGF-I, IGF-II y EGF (factor de crecimiento epidérmico, "epidermal growth factor") provocan una redistribución rápida y transitoria de los receptores de Man-6-P (tanto los dependientes como los independientes de cationes) de los depósitos intracelulares a la superficie celular (126).

#### **1.1.4.5. Papel biológico.**

Como ya se señaló antes, en la mayoría de las células coexisten los receptores tipo I y II y muchas células poseen además receptores de insulina. El hecho de que la insulina a concentraciones suprafisiológicas sea mitogénica y los IGFs a concentraciones suprafisiológicas tengan efectos metabólicos insulinomiméticos se ha interpretado como que los efectos metabólicos están mediados por el receptor de insulina y los efectos mitogénicos por el receptor tipo I, permaneciendo sin esclarecer el papel biológico del receptor tipo II (1). El empleo de anticuerpos contra receptores de insulina o receptores tipo I y los experimentos con células que sobreexpresan alguno de estos receptores han

mostrado que ambos receptores son capaces de mediar respuestas tanto metabólicas como mitogénicas a insulina e IGF-I (45). Sin embargo, *in vivo*, la insulina regula primordialmente las respuestas metabólicas y los IGFs las respuestas mitogénicas; lo que determina los diferentes papeles fisiológicos de ambas hormonas es la distribución de los dos receptores en las distintas células y/o la farmacodinamia de las dos hormonas (132). Por ejemplo, en la rata los tres tejidos principales responsables del efecto hipoglucemiante agudo de la insulina son el parénquima hepático, el músculo y el tejido adiposo; de ellos sólo el músculo expresa niveles del receptor tipo I similares a los del receptor de insulina. A la inversa, la mayoría de los demás tejidos expresan mayores cantidades de receptores tipo I que de receptores de insulina. Así, diferentes células y tejidos responderán selectivamente a bajas concentraciones de insulina o IGF-I en función del receptor que expresen (45).

El papel fisiológico del receptor tipo II no está esclarecido, y los escasos estudios que le asignan un papel en la mediación de respuestas biológicas de IGF-II son difíciles de interpretar. Este receptor puede incluirse en el grupo de los receptores de membrana implicados en el transporte de nutrientes (como el receptor de LDL y transferrina), caracterizados por un dominio intracitoplasmático corto que carece de actividad tirosina quinasa intrínseca, localización predominante en membranas intracelulares y reciclaje independiente de ligando, características que contrastan con las de la familia de receptores de factores de crecimiento (receptor de insulina y receptores tipo I entre otros) (131). Está bien establecido, sin embargo, el papel del receptor tipo II en la distribución y endocitosis de enzimas lisosómicas (136). Se cree también que IGF-II se podría unir al receptor tipo II no para promover el crecimiento, sino para ser internalizado y degradado, participando así el receptor en el aclaramiento de IGF-II (138). La unión de otras hormonas al receptor tipo II en la superficie celular puede resultar en su activación, como es el caso del precursor de TGF- $\beta$ 1 (factor de crecimiento transformante- $\beta$ 1, "transforming growth factor- $\beta$ 1"), hormona que porta residuos de Man-6-P y tiene efectos sobre el crecimiento y la diferenciación celulares (139). Se desconoce si la activación tiene lugar en la superficie celular o tras la internalización en endosomas acidificados. Finalmente, diversos datos sugieren que las moléculas del receptor tipo II de la superficie celular sirven para anclar hidrolasas ácidas y permitirles degradar los proteoglicanos peri y extracelulares con mayor eficacia (126).

## **1.2. Papel de la insulina y los IGFs en el desarrollo fetal y neonatal**

### **1.2.1. Control hormonal del crecimiento fetal.**

El crecimiento de los mamíferos en etapa fetal está determinado por diversos factores. En una amplia revisión de esta materia Gluckman y Liggins (24) cuantifican la contribución de diversos factores, tanto genéticos como ambientales, al crecimiento fetal

(y su impacto, por tanto, en el peso al nacimiento), y la cifran en un 38% y un 62% respectivamente. Aunque hay abundantes datos acerca del papel de diversos factores ambientales (nutrición, estatus socioeconómico, enfermedades, tóxicos, etc.), son escasos los conocimientos que se poseen acerca del mecanismo a través del cual estos factores afectan al proceso de crecimiento (140). En la etapa postnatal el crecimiento está claramente bajo control endocrino central, fundamentalmente a través del eje GH-IGF (Ver más adelante). Sin embargo, hay pocos datos que apoyen la existencia de un mecanismo similar en etapa fetal. Diversos sistemas endocrinos (eje hipófisis-suprarrenales, eje hipófisis-tiroides, GH, lactógeno placentario) han sido implicados en algún momento en el crecimiento fetal, pero datos clínicos o experimentales han demostrado posteriormente que su papel es, en algunos de ellos, a lo sumo permisivo (24, 140). Sólo la insulina parece tener un papel relevante en el crecimiento fetal, como se reseñará más adelante, pero aun así es difícil separar los efectos somatotrópicos directos de esta hormona de los efectos secundarios sobre el metabolismo de los carbohidratos y los lípidos (141).

Se ha planteado la hipótesis de que el crecimiento fetal está controlado, en los tejidos individuales, por el aporte de nutrientes y por factores locales. La transición a la vida postnatal conllevaría la adquisición por las células de mecanismos más complejos e interrelacionados con vistas a otro tipo de regulación del crecimiento en respuesta a un ambiente endocrino (140). En los últimos años la atención se ha centrado en las acciones paracrinas y autocrinas de los factores de crecimiento, especialmente los IGFs y sus proteínas ligadoras. El sistema IGF podría intervenir en el crecimiento del feto tanto del lado fetal como del lado materno (sobre todo por lo que se refiere a la placenta) (141, 23).

### **1.2.2. Papel de la insulina en el desarrollo fetal.**

La evidencia del importante papel de la insulina fetal en la regulación del crecimiento fetal se ha obtenido de estudios clínicos y experimentales de situaciones de hiper e hipoinsulinemia (24, 142). Tanto la agenesia pancreática como el leprechaunismo (resistencia a la insulina por defecto postreceptor) se asocian con una reducción marcada del peso y la longitud al nacimiento. La diabetes mellitus transitoria del recién nacido se asocia frecuentemente con retardo del crecimiento intrauterino. La hipoinsulinemia experimental, inducida en conejos y monos mediante ablación química del páncreas, apoya la idea de que la deficiencia de insulina fetal conduce al retardo de crecimiento. Por otro lado, los hijos de madre diabética no controlada durante la gestación nacen generalmente macrosómicos, salvo cuando la diabetes es severa y se acompaña de vasculopatía e hipertensión, en cuyo caso se produce retardo del crecimiento debido a alteración del flujo placentario provocada por la microangiopatía. La macrosomía que se produce en estos casos se considera consecuencia de la hiperglucemia fetal, que conduce a hiperinsulinemia fetal y a un incremento del contenido pancreático de insulina. Se ha descrito también macrosomía en lactantes con insulinomas o con nesidioblastosis (hiperplasia de células B),

así como en el síndrome de Wiedemann-Beckwith, caracterizado por organomegalia generalizada e hipoglucemia; en este último síndrome no hay hiperplasia de células B pero sí un incremento del número de receptores de insulina. La mayor parte del sobrepeso en todos estos casos es debida al depósito de tejido adiposo, como ha sido confirmado en modelos de hiperinsulinemia fetal (en mono Rhesus) o hiperglucemia fetal (en rata) (141).

Sin embargo, es difícil disociar los efectos somatotrópicos directos de esta hormona de los efectos indirectos a través del metabolismo fetal. En efecto, la insulina tiene un papel dual en la vida prenatal (141). En el humano la insulina actúa como hormona glucorreguladora en el último trimestre del embarazo, cuando la célula B responde a glucosa. En esta etapa el resultado de la hipersecreción de insulina no es hipoglucemia, sino depósito de grasa, ya que el feto recibe un aporte intravenoso continuado de nutrientes. En etapas mucho más tempranas la insulina, secretada probablemente por estímulo de los aminoácidos, crea un ambiente anabólico en el feto que favorece la síntesis y secreción de una serie de factores de crecimiento polipeptídicos, entre ellos IGFs, que actúan de manera autocrina o paracrina (141).

#### **1.2.2.1. Desarrollo ontogénico de la insulina y su receptor.**

La insulina se detecta en el páncreas fetal humano en etapa relativamente temprana de la gestación, hacia la semana 8-12; en la sangre fetal se ha detectado esta hormona hacia la semana 12-14 (143). En la rata la insulina se detecta en el páncreas fetal en el día 11, cuando se desarrolla el rudimento de este órgano; en esta especie el páncreas madura rápidamente a partir del día 17 de gestación, junto con el contenido de insulina. No hay datos sobre la producción extrapancreática de insulina en etapa fetal, en contraste con resultados obtenidos en no mamíferos y en mamíferos adultos (144). A partir del día 19 el feto de rata muestra niveles elevados de insulina circulante; se considera que esta hiperinsulinemia es fisiológicamente importante en procesos metabólicos fetales, como el control del metabolismo de la glucosa en el hígado, la síntesis de glucógeno hepático y la inducción de enzimas hepáticas (145, 146).

La secreción de insulina por el páncreas fetal es insensible a glucosa hasta aproximadamente la semana 28 de gestación en humano o el día 18½ en la rata (141). En ambas especies el desarrollo de sensibilidad a la glucosa precede al acúmulo de tejido adiposo subcutáneo y profundo; ambos acontecimientos podrían estar ligados causalmente. Por otro lado, el cambio de patrón de crecimiento celular en numerosos órganos en esta misma etapa apoya la idea de que la insulina tiene un papel anabólico en el tercer trimestre de la gestación humana (147): entre las semanas 12 y 24 el crecimiento se debe principalmente a incremento del número de células, con escaso incremento del tamaño celular; posteriormente la tasa de división decrece, mientras que el tamaño celular se

incrementa rápidamente. Esto es compatible con un efecto de la secreción de insulina estimulada por glucosa sobre la síntesis de proteína y la lipogénesis.

En el hígado fetal humano el número de receptores de insulina se incrementa entre las semanas 15 y 25, pero no posteriormente, mientras que la afinidad es notablemente más alta a partir de la semana 26, en comparación con estadios más tempranos. También en la rata se produce un incremento progresivo con la edad de gestación en la capacidad y afinidad de ligamiento de insulina, que son más altas a término que en el adulto (141). En la rata se han detectado receptores de insulina en preparaciones de membranas de embriones en estadio de neurula (días 10,4 y 11,6); el ligamiento específico de insulina marcada radiactivamente fue mayor en el saco vitelino que en el propio embrión (144). En humano los estudios de ligamiento han revelado receptores de insulina y de IGF-I en membranas de cerebro, hígado, riñón, pulmón y glándulas adrenales de fetos de 10-17 semanas de gestación (144).

### **1.2.3. Papel del sistema IGF durante el desarrollo.**

Como ya se señaló en la primera parte de esta introducción, la presencia y acción de los IGFs, sus receptores y sus proteínas ligadoras tienen lugar en momentos particulares del desarrollo y de manera específica en cada tejido. Se comprende así que para que tengan lugar de manera adecuada los procesos del desarrollo sean necesarias las interacciones apropiadas entre estos elementos. Los datos que se poseen acerca del patrón de desarrollo de los componentes del sistema IGF proceden principalmente de estudios en roedores (sobre todo rata) y en humano (9, 148).

#### **1.2.3.1. Desarrollo ontogénico de los IGFs.**

##### **1.2.3.1.1. Niveles circulantes de IGF-I y II.**

El patrón de desarrollo de IGFs circulantes está bien establecido en la rata. La disponibilidad en los últimos años de IGFs recombinantes ha permitido el desarrollo de RIAs específicos (105) mediante los cuales se han confirmado los datos aportados por los primeros trabajos sobre este aspecto (149-151), según los cuales los niveles de IGF-II son elevados en el feto y experimentan un progresivo descenso durante las tres primeras semanas de vida postnatal, hasta hacerse prácticamente indetectables; los niveles de IGF-I, por el contrario, son bajos en el feto, y se incrementan en periodo postnatal. En torno al destete se sitúa el momento en que tiene lugar el cambio del predominio de IGF-II a IGF-I en suero; este momento coincide aproximadamente con la entrada en funcionamiento de la regulación del crecimiento y la producción de IGF-I a través de GH (14). Es precisamente este patrón de desarrollo el que ha llevado a considerar al IGF-II como un



factor de crecimiento primordialmente fetal, mientras que IGF-I se cree especialmente importante en el crecimiento y desarrollo postnatales (14).

Estudios efectuados en fetos humanos han descrito un incremento de los niveles (medidos en sangre del cordón umbilical) tanto de IGF-I como de IGF-II a lo largo de la segunda mitad de la gestación (152, 153). La concentración de ambos IGFs, sobre todo IGF-I, es inferior a la del individuo adulto, y en la mayoría de los estudios hay correlación positiva con el peso fetal (152-154), siendo sus niveles bajos en recién nacidos pequeños para su edad de gestación. Al nacimiento la concentración de IGF-I en sangre del cordón umbilical es aproximadamente la mitad de la que se encuentra en el suero adulto normal, y permanece baja durante los primeros días, debido probablemente a un retraso en alcanzar la nutrición calórica plena (155). A lo largo de la infancia tiene lugar un incremento lento y progresivo en la concentración de IGF-I, con un pico en torno a la pubertad; posteriormente se produce un descenso gradual, alcanzándose los niveles medios del adulto al principio de la treintena (14); en el anciano los niveles de IGF-I son un 30-40% inferiores a los del individuo joven (156). Los niveles de IGF-II en feto son similares a los del adulto (154) y, a diferencia de lo que sucede en la rata IGF-II se halla presente en la circulación a concentraciones considerables. La concentración de IGF-II no cambia significativamente durante la pubertad (14).

#### **1.2.3.1.2. Expresión de los genes de IGF-I y II.**

Como IGF-I y II son producidos por la mayoría de los tejidos, los niveles circulantes de IGFs no reflejan la producción tisular local. Esta última puede estudiarse de manera más apropiada midiendo los niveles de mRNA en estado estacionario como índice de la expresión génica (148).

En la rata los niveles más altos de mRNA de IGF-II se dan en los tejidos fetales y neonatales, y descienden notablemente conforme avanza el desarrollo postnatal, de manera que hacia la 3ª semana es prácticamente indetectable en la mayoría de los tejidos del adulto, excepción hecha del cerebro y médula espinal (9). IGF-II es el único péptido insulínico que se detecta en estadio preimplantativo; sus transcritos se detectan ya en estadio de 2 células en ratón (157). En feto el mRNA de IGF-II abunda en hígado, músculo, intestino, piel, pulmón y timo, siendo más bajos los niveles en corazón, riñón y cerebro (158-162). El mRNA de IGF-II también se expresa en gran cantidad en la placenta desde el 12º día de gestación (163). Los estudios de hibridación in situ efectuados en la rata fetal (días 10 a 16) (42) han mostrado reacción positiva en la mayor parte de los tejidos de origen mesodérmico y en muy pocos de origen endo y ectodérmico.

En feto humano se ha detectado mRNA de IGF-II en diversos tejidos entre las semanas 7 y 20 de gestación (9). Se han observado niveles altos en hígado, glándulas

suprarrenales, músculo esquelético, riñón, piel y páncreas, y bajos en intestino, corazón, pulmón, estómago y bazo. En varios de estos tejidos el mRNA de IGF-II es más abundante que el de IGF-I (54). El mRNA de IGF-II se expresa también en placenta (a niveles altos), cordón umbilical, amnios, trofoblasto y saco vitelino (43). En contraste con la rata, el mRNA de IGF-II se expresa en numerosos tejidos del adulto, aunque a niveles considerablemente inferiores a los hallados en tejidos fetales (43).

La expresión del gen de IGF-I es menor en hígado fetal y neonatal que en hígado adulto, y se incrementa con la edad postnatal de manera paralela a los niveles séricos de IGF-I (9). El patrón de desarrollo postnatal de la expresión del gen de IGF-I es específico de tejido (164). Algunos tejidos (corazón, hígado) exhiben el patrón hepático, en tanto que en otros órganos la expresión decrece significativamente en estadios postnatales (estómago, músculo). En cerebro se produce un incremento hasta el 8º día postnatal, y a partir de ahí los niveles descienden. Además se ha comprobado que las distintas variantes del mRNA de IGF-I se expresan de distinta manera durante el desarrollo (164). En el adulto el mRNA de IGF-I se expresa en todos los tejidos examinados, especialmente en el hígado, que muestra los niveles más altos (165). Mediante hibridación *in situ* e hibridación en solución se ha demostrado que IGF-I se expresa también en tejidos embrionarios (162), lo que sugiere un importante papel de este factor de crecimiento en etapas precoces de la diferenciación y el desarrollo, quizás como factor de crecimiento tisular autocrino-paracrino.

En humano IGF-I se detecta en diversos tejidos fetales a partir de la 9ª semana de gestación (166, 167), aunque la abundancia de su mRNA es menor que la del de IGF-II (168). Al igual que IGF-II, su expresión predomina en tejidos de origen mesodérmico (168).

### **1.2.3.2. Desarrollo ontogénico de las IGFBPs.**

#### **1.2.3.2.1. IGFBPs circulantes.**

En uno de los primeros trabajos sobre la ontogenia de las IGFBPs en suero de rata White y cols. (128) advierten el predominio en feto de 19 días de una forma de IGFBP de bajo peso molecular, diferente de la que predomina en adulto, que es de alto peso molecular. La transición entre ambas tiene lugar durante la tercera semana de vida postnatal. Trabajos posteriores, en los que se emplean técnicas de "blotting", inmunoprecipitación y RIA, han permitido una caracterización más precisa del patrón de formas de IGFBPs a lo largo del desarrollo.

IGFBP-2 es la principal proteína ligadora del suero de rata fetal (169), persiste a niveles elevados en etapa postnatal hasta los 17-23 días (105) y en el adulto sus niveles son

bajos (169-171). IGFBP-3, prácticamente indetectable en suero fetal, es la forma predominante en el adulto (171). En el suero de rata adulta la segunda forma más abundante, determinada por RIA, es IGFBP-4 (111). La transición entre los patrones del feto y del adulto se produce hacia la tercera semana de vida postnatal, y es concomitante con los cambios ya descritos en los niveles séricos de IGF-I y II (103).

En suero fetal humano predominan también las formas de bajo peso molecular (172), aunque la mitad del IGF en suero del cordón umbilical está presente en complejos de 150 kDa (en comparación con el 75% en el suero adulto) (173). Los niveles de IGFBP-1 y 2 determinados por RIA (9) son más elevados en suero fetal que en adulto. Mediante "Western ligand blot" IGFBP-2 aparece como la forma más abundante en suero fetal (70); en menor proporción se detectan también IGFBP-1, 3 y 4. La concentración de IGFBP-3, medida por RIA, es baja también en edad infantil, y aumenta con la edad hasta la adolescencia (104).

#### **1.2.3.2.2. IGFBPs en tejidos.**

La expresión de los genes de IGFBP-1 y 2 está también regulada ontogénicamente (174). En la rata el mRNA de ambos se encuentra a niveles más altos en hígado que en otros tejidos fetales (175, 176). IGFBP-2 también se expresa en riñón, intestino y pulmón fetales, más abundantemente que en los tejidos correspondientes del adulto (101). Los transcritos de esta IGFBP se localizan predominantemente en células de origen ecto y endodérmico, se expresan en zonas concretas del sistema nervioso durante la organogénesis temprana y no se colocan con el mRNA de IGF-II (177). Los niveles hepáticos del mRNA de estas dos formas, IGFBP-1 y 2, permanecen elevados el día 1 postnatal y descienden hacia el día 21 (92). En cerebro adulto, en cambio, el mRNA de IGFBP-2 continúa expresándose a altos niveles (74). En humano se han encontrado niveles de mRNA de IGFBP-1 entre 5 y 10 veces más elevados en hígado fetal que en hígado adulto (178).

El mRNA de IGFBP-3 se ha detectado en hígado y riñón de ratas de 1 día, y durante la primera semana sus niveles se incrementan 3-4 veces, permaneciendo constantes a partir de la primera semana (75). Por tanto, el incremento que se produce en la circulación durante este periodo no refleja un aumento en la abundancia del mRNA de IGFBP-3 en hígado o riñón, conclusión similar a la obtenida en estudios en el mono Rhesus (179).

No se poseen datos acerca del patrón ontogénico de las demás formas de IGFBPs.

#### **1.2.3.3. Desarrollo ontogénico de los receptores de IGF.**

##### **1.2.3.3.1. Receptor tipo I.**

En la rata la expresión del receptor tipo I, determinada por la medición de los niveles de mRNA en estado estacionario o por técnicas de ligamiento, es máxima prenatalmente y declina postnatalmente hasta los niveles del adulto, sin que se conozcan los mecanismos de esta atenuación (180, 181). Los altos niveles de expresión de este receptor en estadios prenatales sugieren, pues, un importante papel en el crecimiento y desarrollo fetales. Durante la organogénesis temprana el mRNA de este receptor se distribuye ampliamente por los tejidos fetales, destacando en el sistema nervioso y en el músculo (182). Se han descrito recientemente dos patrones celulares de expresión del gen del receptor tipo I durante el desarrollo cerebral de la rata (183): las células de estirpe neuroepitelial tienen un nivel basal de expresión del gen de los receptores, que podrían constituir dianas para IGFs del líquido cefalorraquídeo y mediarían funciones básicas metabólicas o tróficas; superpuesto a este patrón constitutivo hay grupos de neuronas que muestran altos niveles de mRNA del receptor junto con la expresión de mRNA de IGF-I durante el periodo de diferenciación postnatal. Estas últimas podrían constituir áreas específicas de acción paracrina de IGF-I en el parénquima cerebral (183). Es posible que este receptor medie la acción de ambos IGFs, ya que los dos se unen y activan el receptor tipo I a concentraciones similares (132).

Por razones técnicas los estudios de receptores tipo I en mamíferos en etapa previa e inmediatamente posterior a la implantación son escasos. En el ratón se demuestran receptores en estadio de ocho células y mórula, con un claro incremento en blastocisto (184, 185). En humano los estudios de ligamiento han mostrado receptores de IGF (y de insulina) en membranas de cerebro, hígado, riñón, pulmón y glándulas suprarrenales de fetos de entre 10 y 17 semanas de gestación (186).

#### **1.2.3.3.2. Receptor tipo II.**

Se ha detectado el receptor en embriones de rata en una etapa tan temprana como 6 días de gestación. Los niveles más altos se dan en los tejidos fetales, produciéndose un marcado descenso al final de la gestación y/o tras el parto, alcanzando entre los 10 y 20 días postnatales sus niveles más bajos (187). También se ha comprobado que los niveles circulantes de este receptor en suero varían con el desarrollo, con altos niveles en suero fetal que declinan marcadamente entre 20 y 40 días después del parto (129). Este patrón ontogénico es paralelo, a grandes rasgos, al que sucede en los tejidos, y al de IGF-II circulante. Estos resultados, obtenidos mediante "immunoblot", se han visto confirmados recientemente con el empleo de un RIA específico para el receptor tipo II de rata (188), comprobándose no sólo una regulación dependiente de la edad, sino también del tejido.

Para comprobar si la regulación de estos cambios en la expresión del receptor en diversos tejidos se ejerce sobre la concentración de mRNA varios grupos han cuantificado

los niveles de éste en diversos tejidos fetales y postnatales por distintas técnicas, como hibridación in situ (189), "slot blot" (190), "Northern blot" e hibridación en solución/protección con nucleasa (191) con resultados esencialmente concordantes. Se ha comprobado un marcado descenso con el paso de la etapa fetal a la postnatal. Sklar y cols. (191) encuentran además una correlación entre los niveles de proteína del receptor y los niveles de su mRNA en diversos tejidos, con niveles máximos en corazón, seguido de músculo, pulmón, intestino, riñón e hígado, y finalmente cerebro. Parece, por tanto, que el nivel de mRNA es un determinante importante de la cantidad de proteína del receptor en la mayoría de los tejidos, lo que sugiere un control a nivel de la transcripción o de la vida media del mRNA (191). El tamaño del receptor también parece cambiar durante el desarrollo en ciertos órganos (disminuye en cerebro e intestino y aumenta en hígado entre 20 días de gestación y 20 días postparto), debido probablemente a diferencias de glicosilación (126).

El patrón ontogénico de este receptor en la mayoría de los tejidos es muy similar al de IGF-II, lo que sugiere un papel importante de ambos en el crecimiento y desarrollo fetales (9). También se ha señalado un papel en la remodelación de tejidos: la necesidad de mayores cantidades de enzimas lisosómicas para la remodelación explica que se requieran mayores cantidades de receptor de tipo II para dirigir esas enzimas a los lisosomas. No se descartan otras funciones derivadas de la actuación del receptor a través de segundos mensajeros intracelulares (187, 191).

#### **1.2.4. Interrelaciones entre la insulina y los IGFs.**

En el feto humano el incremento de actividad de las células B, en particular en lo que respecta a la secreción de insulina estimulada por glucosa, coincide con un incremento gradual en los niveles circulantes de IGF-I (147). En gestaciones complicadas con diabetes o con retardo del crecimiento intrauterino los niveles elevados o disminuidos de insulina se acompañan de niveles de IGF-I en sangre del cordón umbilical elevados o disminuidos, respectivamente (192). Esta posible interrelación entre insulina e IGF se ha comprobado experimentalmente en modelos animales de hiperinsulinemia, endógena o exógena, en los cuales se ha observado un incremento en la actividad somatomedina circulante (141). Se cree que la insulina es un importante regulador de la síntesis de IGF durante la etapa fetal, como ya se ha expuesto antes (Ver 1.1.2.5.1.).

La interacción entre la insulina y los IGFs podría constituir un mecanismo mediante el cual la insulina ejerce sus efectos sobre el crecimiento fetal (141). Como ya se ha comentado (Ver 1.1.4.5.), en muchos tipos celulares estudiados coexisten el receptor de insulina y los receptores de IGF. Insulina e IGFs comparten además efectos biológicos, por lo que cabe la posibilidad de que la acción de la insulina promoviendo la replicación celular esté mediada por receptores de IGF. Las acciones metabólicas de la insulina,

estimulando la captación de glucosa y aminoácidos por las células, contribuyen también de manera importante al crecimiento fetal (24). No debe perderse de vista el papel de las IGFBPs (especialmente las de bajo peso molecular), que se sintetizan también en etapa fetal por diversos tejidos, como reguladoras de la disponibilidad de IGFs por los tejidos (122).

Tanto los receptores de insulina como los de IGF están presentes en la placenta humana (en la rata el ligamiento específico de IGF-I es escaso) (193, 194). El ligamiento de insulina es máximo hacia las 28 semanas de gestación, pero las placentas de recién nacidos pequeños para su edad de gestación poseen menos receptores que las de recién nacidos, a término o prematuros, de peso adecuado (195). Los mRNAs de IGF-I y II se han detectado en la placenta humana en el segundo trimestre de la gestación; el mRNA de IGF-II es dos órdenes de magnitud más alto que el de IGF-I (23). Aunque la función de estos péptidos en este órgano no está aclarada, podrían intervenir localmente regulando el crecimiento de la placenta o la transferencia de nutrientes a través de ella.

La familia de péptidos insulínicos desempeña un importante papel también en el metabolismo, proliferación y diferenciación celulares en etapas muy tempranas del desarrollo de los mamíferos (144, 157). Estudios en embriones de ratón en etapa de preimplantación han mostrado que el mRNA de los receptores de insulina y de IGF se expresa en el estadio de 8 células, mientras que de los péptidos sólo se expresa el de IGF-II (en el estadio de 2 células). Se cree que en esta fase el embrión responde a la insulina (probablemente de origen materno, ya que se detecta por inmunohistoquímica en el tracto reproductivo materno) y a IGF-II de manera proliferativa, lo que aseguraría su implantación. Posteriormente estos dos péptidos, además de IGF-I, actuarían como agentes de diferenciación (157).

#### **1.2.5. IGFs e IGFBPs durante la gestación.**

Tanto los IGFs como las IGFBPs están alterados en el suero materno durante la gestación. En la rata los niveles de IGF-I en suero y de mRNA de IGF-I en hígado son bajos al final de la gestación, y se recuperan poco después del parto (196, 197). En la mujer, por el contrario, los niveles de IGF-I en suero experimentan un incremento progresivo a lo largo de la gestación, alcanzando los valores más altos en el último trimestre. Poco después del parto tienden a recuperarse los niveles de IGF-I presentes en la mujer no gestante (198-201). Se ha sugerido que este incremento resulta del efecto de hormonas liberadas por la placenta (lactógeno placentario fundamentalmente), aunque una explicación alternativa es que se debe al incremento de los niveles de IGFBP-1 que tiene lugar en la gestación (23). En cuanto a IGF-II se han descrito elevaciones más ligeras de sus niveles (200), aunque otros autores no encuentran cambios (201).

La concentración de IGFBP-1 en suero aumenta en la mujer a lo largo de la gestación, alcanzando un pico a término, con unos valores 10 veces superiores a los normales en la mujer no gestante (82, 202, 203). Esta elevación es paralela a la que experimentan los niveles de progesterona. La regulación de la expresión del mRNA y de la síntesis de esta proteína en el endometrio/decidua está bien establecida, suponiéndose que es este tejido el origen de su síntesis durante la gestación (204, 205). En la rata se ha observado un incremento en la expresión hepática del mRNA de IGFBP-1, junto con el de IGFBP-4, en la segunda mitad de la gestación (197). Los niveles en suero de IGFBP-1 en suero se correlacionan inversamente con el peso del recién nacido, por lo que se ha especulado con la posibilidad de que esta IGFBP pueda actuar inhibiendo la acción de IGF-I sobre el crecimiento de la placenta y, secundariamente, sobre el feto (23).

En cuanto a los niveles de IGFBP-3 medidos mediante RIA, se ha descrito, en la mujer, una elevación de los mismos, que casi se doblan durante el último trimestre de la gestación (104). También se produce un moderado incremento de los niveles de ALS inmunorreactiva al final de la gestación (66). Por el contrario, IGFBP-3 es prácticamente indetectable en el suero mediante "Western ligand blot", tanto en humano como en roedores (196, 206, 109), hecho que se ha atribuido a la presencia de una proteasa (Ver 1.1.3.5.3.) que produciría fragmentos incapaces de ligar IGFs pero susceptibles de reaccionar inmunológicamente (108). No se ha determinado la concentración de IGFBP-3 en rata mediante RIA, pero se ha comprobado que la abundancia de su mRNA hepático no se altera en la rata durante la gestación (197). La discrepancia entre los resultados del RIA y del "Western ligand blot" se ha atribuido también a una alteración en la capacidad de IGFBP-3 de ligar IGF yodado (207). El papel fisiológico de esta proteasa durante la gestación no está claro. Se ha postulado que los cambios funcionales en IGFBP-3 durante la gestación, debidos a desestabilización del complejo de 150 kDa por la actividad proteasa, resultarían en un incremento de la disponibilidad de IGFs para el crecimiento fetoplacentario (110).

### **1.3. IGFs, estado nutricional e insulina**

#### **1.3.1. IGFs y estado nutricional.**

##### **1.3.1.1. IGFs como señales de crecimiento dependientes de nutrientes.**

Se considera actualmente que los IGFs son importantes mediadores de los cambios inducidos por nutrientes en las respuestas anabólicas (208). Se ha comprobado que la tasa de síntesis de IGF-I en los tejidos y su secreción a la circulación sistémica no sólo depende de la GH procedente de la hipófisis, sino también del aporte adecuado de nutrientes. En efecto, la administración de GH a ratas o humanos ayunados resulta en un incremento de la concentración de IGF-I en plasma menor que el que se observa cuando la GH se

administra a animales alimentados (209). El control de la síntesis y secreción de IGF constituiría así un mecanismo intermedio de señalización que indicaría a las células diana que se han ingerido los nutrientes adecuados y están disponibles para la síntesis de proteínas y la división celular (208).

En este mecanismo de señalización dependiente de nutrientes ha de considerarse también la relación entre IGF-I e insulina. Es posible que en algún momento de la historia evolutiva un precursor primordial de insulina e IGFs pudiera haber ligado directamente la ingesta de nutrientes con la estimulación del crecimiento celular. Posteriormente la insulina pasó a funcionar como un mecanismo de control del metabolismo de los carbohidratos después de la ingesta, mientras que IGF-I permaneció como un estímulo más elemental estrechamente relacionado con la ingesta total de energía y nutrientes (208). La similitud estructural entre ambos péptidos y entre los receptores respectivos permite un solapamiento tanto en la especificidad de unión a estos como en la transducción de señales. Este solapamiento sugiere que las interacciones entre ambos péptidos deben estar, a su vez, coordinadas.

#### **1.3.1.2. Regulación de los IGFs por el estado nutricional.**

El papel de la nutrición en la regulación de los IGFs se vislumbró por vez primera cuando Grant y cols. (210) observaron que la actividad biológica de las somatomedinas (IGFs) en suero era baja en niños con malnutrición proteico-calórica, a pesar de contar con niveles elevados de GH. El desarrollo de mejores métodos de cuantificación de IGFs ha permitido ampliar nuestros conocimientos sobre el control nutricional de los IGFs. Aunque en periodo postnatal el papel de IGF-I como mediador de los cambios en las respuestas anabólicas a la ingesta de nutrientes está relativamente aclarado, como se expone a continuación, es difícil proponer un papel similar para IGF-II, ya que se ha comprobado que sus niveles no cambian incluso tras una privación nutricional extrema, como por ejemplo un ayuno de 10 días (211). De hecho, el papel fisiológico de IGF-II en etapa postnatal no está aclarado (Ver 1.1.2.6.2.).

La mayoría de los estudios se han dirigido a desvelar los mecanismos que intervienen en los cambios en los niveles de IGF-I circulante en situaciones de privación de nutrientes. Para ello se ha empleado fundamentalmente la rata como modelo animal, aunque hay también numerosos estudios en humano; estos estudios se han centrado en el hígado, principal fuente de IGF-I circulante. Llama la atención en estos estudios la diversidad de modelos de alteración del estado nutricional, con tipo, duración e intensidad de la manipulación dietética variables, lo que dificulta en muchos casos la interpretación y la comparación de los resultados de los distintos trabajos. Hay que hacer notar también que la inmensa mayor parte de estos trabajos se han efectuado en la rata en periodo posterior al destete. En su reciente revisión sobre el tema Clemmons y Underwood (208)



resumen los estudios efectuados hasta la fecha, tanto en rata como en humano, en tres apartados: ayuno, restricción proteica y restricción calórica. Vamos a sintetizar a continuación los resultados obtenidos en modelos en rata.

#### **1.3.1.2.1. Ayuno.**

En la rata sometida a ayuno se ha observado una marcada reducción en los niveles séricos de IGF-I (37) junto con un descenso en los niveles de su mRNA en hígado (212) y otros órganos (213), y en la tasa de transcripción del gen de IGF-I (214), lo que apunta a que el mecanismo de la reducción de los niveles de péptido es transcripcional. Se ha comprobado además un descenso en la unión de GH a su receptor (37), que se acompaña de un descenso paralelo en la abundancia del mRNA del receptor de esta hormona (214). La realimentación posterior al periodo de ayuno hace que estas alteraciones se reviertan, aumentando la unión de GH a su receptor, la concentración de IGF-I circulante y los niveles de mRNA de IGF-I hepático (214).

#### **1.3.1.2.2. Restricción proteica.**

También las ratas sometidas a restricción proteica muestran, además de un retardo del crecimiento, una reducción en los niveles séricos de IGF-I (38), junto con un descenso en la cantidad de su mRNA en hígado (102, 215, 216) y en músculo esquelético (217). Análogamente a como sucede en el ayuno, las alteraciones parecen tener lugar a nivel pretraduccional, bien en la transcripción, bien en la estabilidad del mRNA, aunque algunos trabajos apuntan también a una alteración a nivel traduccional (218). Además de estar disminuida la producción de IGF-I se ha comprobado que existe un aclaramiento más rápido de IGF-I del suero; se ha sugerido que el descenso concomitante que se produce en la IGFBP-3 facilitaría la unión a las proteínas ligadoras del complejo de 50 kDa y con ello el paso hacia el espacio extracelular, donde se degradaría (219).

El mecanismo a través del cual se produce este descenso en los niveles de IGF-I circulante parece diferir del que interviene en el ayuno. La unión de GH a su receptor está sólo ligeramente reducida (38) pero no lo suficiente como para explicar que la respuesta de IGF-I sérico al tratamiento con GH esté tan notablemente disminuida, ya que se requieren dosis farmacológicas de esta hormona para recuperar los niveles normales de mRNA hepático de IGF-I (218). Parece por tanto que el descenso de IGF-I en la restricción proteica se debe a una resistencia a GH a nivel postreceptorial, y no a una reducción del número de receptores (220, 221). Se ha comprobado que los efectos de la privación proteica dependen de la edad, siendo menos intensos en los animales de más edad (216, 222-224).

Además de la resistencia a GH la restricción proteica provoca una resistencia a la acción periférica de IGF-I. En efecto, la infusión de IGF-I a ratas sometidas a restricción proteica no restablece los parámetros tróficos (incremento de peso, longitud de la cola, etc) (225); aunque provoca una disminución de la degradación de proteínas, pero no altera la síntesis proteica (226). Sin embargo, algunas acciones de IGF-I, como el estímulo de la producción de IGFBP-3, no se ven alteradas. En cambio, la infusión de IGF-I a ratones ayunados es capaz de atenuar la pérdida de peso (227), lo que sugiere que IGF-I tiene un papel directo como mediador de los cambios tróficos inducidos por el ayuno.

#### **1.3.1.2.3. Restricción calórica.**

El efecto de la restricción calórica pura sobre los mecanismos moleculares que controlan la síntesis y secreción de IGF-I no ha sido estudiado en profundidad. En un modelo de restricción calórica en rata se ha descrito un descenso en los niveles de IGF-I y su mRNA en hígado proporcional al grado de restricción (103). En algunos trabajos se ha estudiado el efecto de la subnutrición proteico-calórica, habiéndose observado un descenso en los niveles de IGF-I circulante (228, 229). En la diabetes experimental, en la que se produce una situación comparable a la restricción calórica debido al despilfarro de nutrientes consecuencia de la alteración metabólica, se ha comprobado un descenso en los niveles de IGF-I circulante y una reducción en la cantidad de mRNA de IGF-I en hígado (39) y otros tejidos (riñón, corazón, diafragma) (216). Análogamente a lo que se ha comentado en modelos de restricción proteica, se ha descrito en la diabetes una anómala respuesta al tratamiento con GH, para la que se han propuesto tanto un defecto postreceptorial (230) como un descenso del número de receptores hepáticos (231).

Como resumen de lo expuesto hasta ahora, parece claro que la restricción de nutrientes provoca un descenso de los niveles de IGF-I circulante y tisular localizada a nivel transcripcional, además de una resistencia a la acción de GH. Los mecanismos que median la resistencia a GH parecen localizarse a distintos niveles de la vía biosintética de IGF, dependiendo del tipo de restricción. Mientras que en el ayuno la resistencia parece deberse a un menor número de receptores, en la restricción proteica la alteración se cree postreceptorial, y en la subnutrición calórica asociada a la diabetes se han descrito ambos mecanismos (208).

#### **1.3.1.3. Regulación de las IGFBPs por el estado nutricional.**

El estado nutricional es un importante factor en la regulación de las concentraciones plasmáticas de las IGFBPs, las cuales, a su vez, determinan la disponibilidad de IGFs por parte de los tejidos, modulando así sus acciones (68). El papel de los nutrientes en la regulación de las IGFBPs se expuso con cierto detalle en 1.1.3.5., por lo que aquí se hará un breve resumen de los datos más relevantes. IGFBP-1 responde a los cambios agudos

en la ingesta de alimento (83). Diversos trabajos parecen indicar que los niveles de insulina y la disponibilidad de sustratos energéticos (carbohidratos sobre todo) son los principales reguladores de la IGFBP-1 circulante (61). Tanto en humano como en rata sus niveles están elevados en el ayuno y la diabetes mellitus; en la rata se ha descrito un aumento en el mRNA hepático de esta proteína en ambas situaciones (92). La realimentación y la infusión de insulina, respectivamente, revierten estos cambios (90, 92). Por lo que se refiere a IGFBP-2, se ha observado un incremento en la abundancia del mRNA hepático de esta proteína en ratas sometidas a ayuno y restricción dietética (tanto proteica como energética) (92, 102, 103). Posiblemente, aunque está por confirmar, esto sea debido a los bajos niveles de insulina presentes en estos animales, ya que otros estudios sugieren que la insulina es el principal regulador de IGFBP-2 (61). El ayuno prolongado, aunque no el de corta duración, y la restricción proteica se acompañan de una reducción en los niveles séricos de IGFBP-3, que tiende a revertir con un aporte energético o proteico normal (107). Sin embargo, esta IGFBP no se ve afectada por los cambios agudos en la ingesta de nutrientes, no experimentando variaciones circadianas (68).

#### **1.3.1.4. Regulación de los receptores de IGF por el estado nutricional.**

Existen muy pocos estudios sobre el papel de los receptores de IGFs en el control de las acciones de estos péptidos en las alteraciones del estado nutricional. Se ha descrito un aumento del ligamiento de IGF-I a receptores de membrana de diversos órganos (pulmón, testículos, estómago, riñón, corazón e hipófisis) en ratas ayunadas (213, 232). Este mayor ligamiento se debe a un aumento de la concentración de receptores y se asocia a un incremento del mRNA del receptor tipo I. En ratas sometidas a restricción proteica se ha descrito igualmente un aumento del ligamiento de IGF-I a membranas de músculo (233). Este fenómeno de "up-regulation" es secundario, probablemente, a los bajos niveles de IGF-I en la circulación o en los tejidos, aunque el descenso en los niveles de insulina que acompaña a estas situaciones puede que contribuya de alguna manera, como se ha demostrado in vitro en fibroblastos humanos (234). Queda por determinar aún el papel fisiológico de estos cambios contrarrestando el descenso de IGF-I.

#### **1.3.1.5. Regulación nutricional de los IGFs y las IGFBPs en el feto.**

Se ha propuesto que la generación de factores de crecimiento polipeptídicos en periodo fetal depende del nivel de anabolismo, el cual a su vez es el producto de un aporte adecuado de nutrientes y del papel preponderante de la insulina en la circulación (141). El estado nutricional parece desempeñar, pues, un importante papel en la síntesis de IGFs también en la etapa fetal, como así lo sugieren datos clínicos y algunos estudios de experimentación animal en modelos muy diversos de retardo del crecimiento intrauterino.

El retardo del crecimiento intrauterino provocado por reducción de la masa placentaria en la oveja o por ligadura de la arteria uterina en la cobaya se acompañan de una reducción de la actividad somatomedina medida por bioensayo (235, 236). Bajos niveles de actividad somatomedina se han descrito también en el suero del cordón umbilical de recién nacidos pequeños para su edad de gestación (237) y en fetos de rata gestante ayunada durante 96 horas (238). Situaciones de ayuno o restricción proteica en la rata gestante (239-241) o de subnutrición crónica en la cobaya gestante (242) se acompañan de un descenso en los niveles de IGF-I fetal. En cuanto a IGF-II, el ayuno en la rata o en la cobaya gestantes provoca una reducción de la concentración sérica de IGF-II en los fetos (236, 241). Cambios similares se han observado en la oveja ayunada al final de la gestación (243) y en la rata gestante sometida a restricción proteica prolongada (239). Por otro lado, la infusión de glucosa a fetos de oveja o cobaya provoca un incremento de la concentración de IGF-II fetal (236, 243), cuyos niveles se correlacionan con la concentración de glucógeno hepático (236).

El papel de los nutrientes en el control de la producción de IGFBPs en el feto es poco conocido. Varios estudios atribuyen un papel preponderante a IGFBP-1 en el control nutricional del crecimiento fetal. En diversos modelos de retardo del crecimiento intrauterino en la rata, como el ligamiento de las arterias uterinas (244, 245), el ayuno (241) o la administración de dexametasona a la rata gestante (246), se ha observado un incremento de los niveles de esta IGFBP (determinados mediante "Western ligand blot" e "immunoblot") en el suero fetal y de la expresión de su gen en hígado, mientras que no se han detectado cambios en IGFBP-2 circulante. Resultados similares, por lo que respecta a IGFBP-1, se han obtenido en los fetos de oveja ayunada al final de la gestación (247) y en casos clínicos de retardo del crecimiento intrauterino (248).

### **1.3.2. IGFs e insulina: efectos de la diabetes en la regulación de los IGFs.**

El papel de la insulina en la regulación de la síntesis y secreción de IGF-I se ha expuesto anteriormente en esta introducción (1.1.2.5.1.), al igual que su importancia y sus interrelaciones con los IGFs en el periodo de desarrollo prenatal (1.2.2. y 1.2.4.). Nos centraremos en este epígrafe en la diabetes postnatal como modelo para el estudio de las interacciones entre insulina e IGF.

#### **1.3.2.1. Efectos de la diabetes en la regulación de IGF-I.**

Existe controversia en lo que respecta a los niveles de IGF-I en la circulación en humanos diabéticos: se han descrito concentraciones disminuidas, normales o elevadas en pacientes con diabetes mellitus dependiente de insulina (249). Esta disparidad se ha atribuido a diferencias en las poblaciones de pacientes (edad, instauración y duración de la diabetes, presencia de obesidad) y a la influencia de las IGFBPs en los métodos de

valoración de IGF. En estudios en los que IGF-I se determinó tras separación de las IGFBPs por cromatografía de exclusión molecular a pH ácido los niveles encontrados fueron bajos en pacientes diabéticos con hiperglucemia (32, 249).

La mayor parte de los estudios de experimentación animal sobre el efecto de la diabetes en la secreción y acciones de los IGFs y sus proteínas ligadoras se han efectuado en ratas adultas, empleando el modelo de diabetes provocada por STZ. En este modelo se ha observado un estado de retardo del crecimiento que se acompaña de niveles de IGF-I bajos en la circulación (39), de su mRNA en hígado y otros tejidos (39, 216) y de su producción por el hígado (250). El tratamiento con insulina incrementa parcialmente estos parámetros y restaura el crecimiento (250, 251). Como en el caso del ayuno (Ver 1.3.1.2.1.), en la rata la GH no induce la expresión del gen de IGF-I ni restablece el crecimiento (33, 251). Esta resistencia a GH, observada también en humanos diabéticos, en los que se han descrito niveles elevados de esta hormona (32, 252), puede deberse a un descenso del número de receptores hepáticos (231) o a un defecto postreceptorial (216, 230).

#### **1.3.2.2. IGFBPs y diabetes.**

Tanto en el hombre como en la rata (en modelos experimentales) la diabetes se asocia a alteraciones en las IGFBPs. En la diabetes por STZ se han descrito niveles disminuidos de IGFBP-3 (61), y su síntesis se induce por IGF-I o tras el restablecimiento de la euglucemia con insulina (51). Por el contrario los niveles de IGFBP-1 en la circulación están elevados, tanto en humano (253) como en rata (51, 91); los mRNAs hepáticos de IGFBP-1 y 2 están también elevados en la rata diabética por STZ, aunque no se ha demostrado un aumento de IGFBP-2 en la circulación (92, 99). La IGFBP-1 circulante parece estar asociada con un inhibidor de la actividad biológica del IGF-I del suero en adolescentes con diabetes mellitus insulino dependiente (254). Los niveles reducidos de IGF-I y elevados de IGFBP-1, que inhibe la acción de IGF-I, se cree que constituyen un mecanismo adaptativo que contribuye al retardo del crecimiento que se observa en los pacientes con diabetes tipo I mal controlada (148).

#### **1.3.2.3. Receptores de IGF y diabetes.**

El papel de los receptores de IGF en la regulación de las acciones de estos péptidos en la diabetes apenas si se ha estudiado. En el modelo de diabetes por STZ se ha descrito un aumento de la expresión y del ligamiento de ambos tipos de receptores de IGF en riñón (255). Se desconoce si este aumento es secundario a la alteración del estado metabólico (hiperglucemia o hipoinsulinemia) o a los bajos niveles de IGF-I en la circulación, aunque la corrección de la hiperglucemia mediante tratamiento con insulina normaliza los niveles de receptores. El aumento de la expresión del receptor tipo I en la diabetes podría

intervenir en el desarrollo de las complicaciones micro y macrovasculares del riñón que se presentan en la diabetes (256).

### **1.3.3. Consideraciones finales. Justificación de los modelos de subnutrición y diabetes empleados en este trabajo.**

De todo lo que se acaba de exponer se desprende la necesidad del estudio de las alteraciones de los IGFs y sus proteínas ligadoras en un mismo modelo de subnutrición establecido en una etapa temprana del desarrollo y en el que se consideren conjuntamente las alteraciones en etapa fetal y lactante. Análoga consideración cabe hacer en la situación de diabetes. En efecto, las alteraciones que se producen en los IGFs y sus proteínas ligadoras dependen del modelo estudiado, así como del estado de desarrollo y del momento en que se establece la subnutrición o la diabetes.

La mayor parte de los estudios acerca de la regulación nutricional de los IGFs y sus proteínas ligadoras se han efectuado en la rata fundamentalmente en modelos establecidos después del destete. Sin embargo, si se quiere extrapolar los resultados obtenidos en el animal de experimentación a las situaciones que se dan en el humano, hay que considerar que en este lo más frecuente es que la subnutrición se establezca ya en etapas precoces del desarrollo: generalmente los niños malnutridos proceden a su vez de madres que habían experimentado algún tipo de carencia nutricional durante la gestación, si no incluso antes (257). Por esta razón hemos elegido una pauta de restricción alimentaria que se instaura en etapa gestante, en concreto el día 16. En ensayos previos se había comprobado la dificultad de obtener un número viable de crías cuando la subnutrición se instauraba en etapas precoces de la gestación (258).

Se ha descrito una amplia variedad de modelos que producen retardo del crecimiento intrauterino (24). Dejando a un lado los modelos basados en la administración de tóxicos (etanol, tabaco, opiáceos, etc.) o en la manipulación endocrina del feto (administración de glucocorticoides a la madre; ablación del páncreas, que se comenta más adelante), para nuestros propósitos interesaban los modelos basados en la alteración del aporte de nutrientes al feto. Esto se ha llevado a cabo en la literatura fundamentalmente de tres maneras: la malnutrición materna, la reducción de la masa placentaria o la reducción del flujo sanguíneo uterino (generalmente por ligadura de la arteria uterina). Estos dos últimos modelos suponen, de entrada, el factor añadido del estrés quirúrgico a que se somete al animal gestante. Son modelos adecuados, si se quiere, para estudiar el retardo del crecimiento intrauterino que se produce en la mujer gestante con diabetes mellitus severa, en la que la microangiopatía de las arteriolas espirales de la placenta provoca una reducción del flujo sanguíneo uterino; sin embargo, se apartan de la situación de subnutrición propiamente dicha.

También en periodo lactante y posterior al destete se han descrito diversos modelos de subnutrición experimental (259), entre los que se cuentan la cauterización de los pezones de la madre, la restricción del tiempo de permanencia de las crías con la madre, el incremento artificial de la población de la camada, la manipulación experimental de la composición de la dieta o la restricción de la cantidad de alimento disponible. En los tres primeros la subnutrición se produce por una disminución en la cantidad de leche accesible a las crías. Sin embargo, conllevan una alteración artificial de la interacción de la madre con las crías y rara vez se dan situaciones similares en el humano. No hay, con todo, ninguna referencia bibliográfica en la que se emplee alguno de estos modelos en el estudio de la regulación de los IGFs en etapa lactante. Algunos estudios en rata lactante se han basado en la administración de nutrientes a las crías por vía intravenosa (224) o intragástrica (215); sin embargo, en este tipo de estudios a los efectos de la subnutrición, se superponen las complicaciones derivadas del estrés quirúrgico que conlleva la implantación de catéteres.

Por lo que respecta a las alteraciones de la composición de la dieta, los modelos más ampliamente estudiados son el ayuno y la restricción proteica, evaluándose en ésta tanto la cantidad como la calidad nutricional de las proteínas de la dieta. Generalmente los animales a los que se suministra una dieta hipoproteica reducen espontáneamente la cantidad total de alimento ingerido, con lo que se instaura en realidad una deficiencia proteico-energética (260). Para nuestro estudio hemos elegido un modelo de subnutrición proteico-energética, que es el tipo de subnutrición más frecuente en el ser humano. En periodo posterior al destete la subnutrición es directa en el animal, por reducción de la cantidad de alimento suministrado; en periodo lactante la subnutrición inducida a través de la restricción materna se debe a un descenso en la producción de leche, sin que esté alterada su composición (261).

Por lo que se refiere a la diabetes, los modelos experimentales más ampliamente utilizados son los de diabetes inducida por la administración de STZ o de aloxano. Los estudios en diabetes clínica son, lógicamente, de alcance más limitado, y hay en ellos una gran disparidad en las poblaciones estudiadas por efecto de la edad, el tipo y la duración de la diabetes, el estatus metabólico, etc. Así pues, para nuestro estudio nos pareció apropiado un modelo de diabetes experimental por STZ estandarizado que permitiera obtener poblaciones homogéneas tanto en rata gestante como en etapa neonatal y en rata adulta.

La mayoría de los estudios de la regulación de IGF y sus proteína ligadoras llevados a cabo en el modelo de diabetes experimental por administración de STZ lo han sido en la rata adulta. En este trabajo hemos empleado un modelo de diabetes por STZ en rata gestante administrando el tóxico el día 16 de gestación, para así hacer comparables los

resultados con los del modelo de subnutrición. Se pretendía con ello además imitar la situación que se da en humano en el feto de madre diabética. En la rata neonatal la diabetes se provocó directamente en la cría a una edad lo suficientemente temprana (4 días) como lo permiten las dificultades técnicas de administrar STZ intraperitonealmente a ratas tan pequeñas.

En este trabajo se ha pretendido el estudio de la interacción entre insulina, nutrientes e IGFs comparando las alteraciones que se producen en el modelo de subnutrición proteico-energética con las que se producen en modelos de diabetes provocados en los mismos periodos de desarrollo del animal. En ambas situaciones, subnutrición y diabetes, los niveles de GH están disminuidos, por lo que la influencia de GH es similar, y por el contrario existen claras diferencias en el estado de la glucemia y la insulinemia que hacen interesante y apropiado este estudio.

#### **1.4. Estado actual de la metodología para el estudio de los IGFs y sus proteínas ligadoras circulantes**

##### **1.4.1. Cuantificación de IGF-I y II.**

Por su sensibilidad y especificidad las técnicas radioinmunológicas, principalmente el RIA, han ido sustituyendo a los bioensayos, radioanálisis de receptores ("radioreceptor assay", RRA) y radioanálisis de proteínas ligadoras ("binding protein assay", BPA) en la cuantificación de IGFs en suero y otros líquidos biológicos. Los bioensayos (incorporación de timidina, sulfatación del cartílago) fueron los primeros en emplearse y la mayor parte de los conceptos actuales relativos a los IGFs proceden de este tipo de estudios (2, 262, 263); tienen el inconveniente de su inespecificidad y de ser influidos por la variabilidad biológica de los tejidos utilizados en el análisis. Son útiles, sin embargo, en la investigación del papel biológico de las IGFs (119, 121). Los radioanálisis de proteínas ligadoras se basan en el empleo de IGFs como sustrato para la competición entre el radioligando y el ligando frío; presentaban la desventaja de su variable especificidad según el origen de la proteína ligadora utilizada (263).

En cuanto a los radioanálisis de receptores, fueron ampliamente utilizados antes de la aparición de los RIAs, y para la valoración de IGF-II continúan siendo procedimientos útiles. Se basan en el hallazgo de que las membranas plasmáticas de adipocitos aislados (264), hígado (264) y placenta humana (193) contienen receptores específicos de IGF. Esto condujo al empleo generalizado del RRA de membranas de placenta humana, con la limitación importante de que este método no distinguía entre IGF-I y II (265). Con el empleo de preparaciones de membranas de hígado o de placenta de rata se ha establecido un RRA de IGF-II altamente específico debido al hecho de que ambos órganos son ricos en receptores de IGF de tipo II y relativamente deficientes en receptores de tipo I (266).



El desarrollo de RIAs altamente específicos para IGF-I y II ha facilitado ampliamente la determinación de los niveles de estos péptidos en líquidos biológicos en estudios clínicos y de investigación básica, gracias al empleo de anticuerpos altamente específicos contra IGF-I y II humanos. Generalmente estos anticuerpos presentan una amplia reactividad cruzada entre especies, lo que ha permitido su empleo en estudios experimentales en especies distintas del humano (14).

La presencia en el suero de proteínas ligadoras de IGF de alta afinidad ha complicado la medición de estos péptidos en el suero por los efectos complejos e imprevisibles de su interferencia en el análisis, ya que compiten con el anticuerpo o el receptor por su unión al radioligando (14). Para superar este inconveniente se han ido desarrollando diversas estrategias, llegándose a la conclusión de que para obtener resultados fiables es necesario, previamente al análisis, disociar y separar las proteínas ligadoras (9, 14). El método de separación considerado hoy por hoy como método de referencia es la cromatografía en columna en medio ácido (filtración en gel o HPLC) (14, 267); sin embargo el procesamiento de cada muestra por este método es laborioso y costoso. Se han desarrollado procedimientos de separación alternativos, más sencillos y rápidos, como la extracción en ácido-etanol (con o sin crioprecipitación) (268), la incubación en medio ácido (269), la cromatografía en cartuchos de SepPak C-18 (270), y recientemente la extracción en ácido fórmico-acetona (271). La mayoría de estos procedimientos han sido desarrollados y validados para la determinación de la concentración de IGFs en suero humano, ovino o bovino; la validación para el suero de rata se ha efectuado sólo en ratas adultas. Como ya se ha señalado anteriormente en esta introducción (Ver 1.1.2.5.), tanto los IGFs como sus proteínas ligadoras están regulados por factores relacionados con el desarrollo y por factores nutricionales, de modo que las concentraciones relativas de ambos se ven modificadas en función del estado nutricional y de la etapa del desarrollo que se considere. Puesto que los métodos alternativos de separación de IGFBPs fueron validados originalmente para la rata adulta, se desconoce su eficacia a la hora de eliminar las IGFBPs del suero en etapas precoces del desarrollo y/o en situaciones en las cuales el estado nutricional se ve alterado, como es el caso de la subnutrición. Puesto que el tema de esta tesis se centra en la influencia de diversos factores nutricionales y hormonales en la regulación de los IGFs y sus proteínas ligadoras, tanto en etapa adulta como durante el desarrollo perinatal, una validación previa de la metodología a emplear está plenamente justificada.

#### **1.4.2. Metodología para el estudio de las IGFBPs.**

Inicialmente, y durante muchos años, las proteínas ligadoras de IGF fueron identificadas por la capacidad de los <sup>125</sup>I-IGFs de formar complejos de alto peso molecular con proteínas del suero o de medios de cultivo (71). Basándose en este hecho, se han

desarrollado varios procedimientos que difieren en el método empleado para la separación del radioligando libre del complejo radiactivo, tras un primer paso de incubación del  $^{125}\text{I}$ -IGF con el suero. Estos procedimientos sólo detectan IGFBPs insaturadas (es decir, sitios de unión libres), salvo que previamente se disocien los IGFs endógenos mediante tratamiento a pH ácido o fraccionamiento (9). Sin embargo, la separación completa de los IGFs puede requerir un tratamiento extremo, y el uso de condiciones ácidas resulta en la disociación del complejo IGFBP-3:ALS. Puesto que el ligamiento de IGF en una mezcla de IGFBPs tal como suero o medio condicionado es una función compleja de la concentración, afinidad, especificidad y grado de ocupación de cada una de las especies de IGFBP presentes, la concentración del radioligando y las condiciones de incubación, estos métodos son más útiles cuando sólo está presente una única IGFBP con su sitio de unión libre; en estas condiciones pueden llevarse a cabo estudios cuantitativos de cinética de ligamiento (9, 272).

El método de "affinity cross-linking" seguido de SDS-PAGE fue descrito inicialmente por Haselbacher y cols. (273) y empleado extensamente por Wilkins y D'Ercole (274) para caracterizar las IGFBPs del suero humano. Tiene la ventaja de que permite identificar las IGFBPs individuales según su tamaño, es muy sensible, y puede aplicarse a proteínas inestables en SDS. Por el contrario, tiene los inconvenientes de que sólo detecta sitios de unión de IGF no ocupados y de que se generan perfiles complejos por reacciones de ligamiento cruzado múltiples (con otras proteínas, formación de polímeros) o ineficaces, lo que distorsiona los resultados (14).

La reciente purificación de varias IGFBPs y de la subunidad ácido-lábil ha permitido la elaboración de anticuerpos poli y monoclonales y su empleo en el desarrollo de análisis inmunológicos para esas proteínas (275). Estos procedimientos permiten la cuantificación específica y exacta de los niveles séricos de IGFBPs y ALS, lo que ha posibilitado estudios cuantitativos de su regulación *in vivo*, en su mayor parte en humano, ya que los anticuerpos son altamente específicos y por lo general no muestran reacción cruzada con las IGFBPs de otras especies (272, 275).

#### **1.4.2.1. Técnicas de "blotting".**

El fundamento de estas técnicas se expone con detalle en Material y Métodos (Ver 2.7.). Brevemente, las IGFBPs separadas mediante SDS-PAGE y transferidas a nitrocelulosa son detectadas, bien mediante anticuerpos específicos ("immunoblot"), bien mediante la unión de un ligando marcado radiactivamente ( $^{125}\text{I}$ -IGF-I o II) ("ligand blot"). Es importante recalcar que el "immunoblot" (al igual que la inmunoprecipitación) requiere el empleo de anticuerpos en exceso, en contraste con el RIA, donde se emplean en concentración limitada. Como todas las IGFBPs comparten numerosas características estructurales, no es sorprendente que epitopos relacionados de diferentes proteínas

muestran reacción cruzada incluso con el empleo de antisueros relativamente específicos cuando se utilizan en técnicas de exceso de anticuerpos; este hecho puede dar lugar a resultados erróneos a la hora de interpretar los experimentos de "immunoblot" (272).

El procedimiento de "Western ligand blot" fue desarrollado por Hossenlop y cols. (276). A diferencia del "immunoblot" permite identificar simultáneamente todas las proteínas ligadoras por su capacidad de ligar  $^{125}\text{I}$ -IGFs. En esta técnica es esencial que la electroforesis se lleve a cabo en condiciones no reductoras, ya que incluso bajas concentraciones de agentes reductores interfieren con la unión de IGF.

El "ligand blot" presenta varias ventajas (14, 61):

- Permite identificar todas las proteínas ligadoras, tanto insaturadas como saturadas, presentes en una muestra y su abundancia relativa. Bajo determinadas condiciones puede emplearse incluso como método cuantitativo (277).
- Elimina el inconveniente del "affinity cross-linking" de la formación de complejos con otras proteínas o la formación de multímeros; el peso molecular refleja el de la proteína ligadora, y no el de un complejo formado por ligamiento cruzado.
- Permite una caracterización más completa de las proteínas individuales, ya que posibilita la comparación de "blottings" paralelos mediante "ligand blot" e "immunoblot", el estudio de la especificidad de unión y la identificación de especies glicosiladas mediante desglicosilación enzimática.

Con todo, este procedimiento presenta algunos inconvenientes. Por ejemplo, cambios en IGFBPs individuales pueden quedar enmascarados por la presencia de IGFBPs de tamaño similar (61) y que migran simultáneamente en los geles. Fragmentos proteolíticos de IGFBPs (por ejemplo en suero de gestante) pueden ser detectados inmunológicamente, pero no mediante "ligand blot", debido a que estos fragmentos presentan menor afinidad por el radioligando (108, 109). Finalmente, algunas IGFBPs, como IGFBP-6, que presentan menor afinidad por IGF-I que por IGF-II pueden no ser detectadas cuando la membrana se incuba con IGF-I (61).

### **1.5. Planteamiento del tema**

Factores nutricionales, genéticos y endocrinos, así como condiciones patológicas de la madre durante el periodo gestante rigen el crecimiento en los mamíferos en periodos de desarrollo (24). En concreto, el conocimiento de los factores endocrinos que intervienen decisivamente en la regulación del crecimiento en etapas de inmadurez —fetal y lactante— ha propiciado múltiples investigaciones. Ello es debido en buena parte a su interés en

pediatría, y en general en clínica, a la hora de prevenir alteraciones del desarrollo que, indudablemente, condicionarán la salud futura de los individuos en múltiples aspectos. En periodo fetal los factores denominados por Gluckman "ambientales" (24), que modulan el ambiente en el cual se desarrolla el feto, influyen en su crecimiento en un 62% aproximadamente, mientras que la implicación de los factores genéticos se estima en un 32% aproximadamente. Sin embargo, un 30%, aproximadamente, de los factores ambientales, según el mismo autor, nos son aún desconocidos.

Los factores de crecimiento similares a insulina (IGF- y II) son polipéptidos que tienen una gran similitud estructural con la proinsulina (8). En etapa postnatal IGF-I (o somatomedina C) se produce fundamentalmente en hígado por efecto de la GH; sin embargo, en periodo fetal su secreción es independiente de esta hormona (22, 23, 24). Las acciones de los IGFs están mediadas por receptores específicos, y ambos polipéptidos circulan en sangre unidos a proteínas ligadoras específicas (IGFBPs), de las cuales se conocen seis formas. No se conoce exactamente la función biológica de estas proteínas ligadoras, pero se cree que modulan la disponibilidad y actividad biológica de estos factores de crecimiento (61, 62). En animal adulto la proteína ligadora más abundante es IGFBP-3, que se detecta en suero formando complejos de alto peso molecular, mientras que en periodos de inmadurez la proteína ligadora cuantitativamente más importante es la IGFBP-2 (169, 171). Este hecho, junto con el distinto patrón ontogénico de los péptidos y sus receptores, apuntan a una distinta función y regulación de dichos factores en ambos periodos. También la insulina tiene un papel relevante como moduladora del crecimiento en periodos de inmadurez (141) pero se desconoce la interacción que indudablemente existe entre los IGFs y la insulina, y en general entre dichos factores y la homeostasis glucídica.

Existe una abundante literatura que pone de manifiesto que tanto los IGFs como sus proteínas ligadoras se regulan por los nutrientes (208), aunque los mecanismos no se conocen totalmente. La mayor parte de los estudios sobre la incidencia de situaciones de restricción dietética sobre los niveles de IGFs y sus proteínas ligadoras en etapas de inmadurez en la rata han sido realizados por separado, bien en periodo fetal, bien en periodo neonatal, empleando además para ello modelos de restricción dietética establecidos en condiciones diversas. La subnutrición provoca en el organismo vivo una situación de adaptación que varía en función de circunstancias como la duración, intensidad y momento en que se instaure la restricción alimentaria. Creemos que sólo en un mismo modelo con condiciones estandarizadas, tal y como el que se utiliza en este trabajo, se podrán comparar las diferentes adaptaciones y los equilibrios que se establezcan en etapa fetal y neonatal como respuesta a la situación de restricción alimentaria.

Otra situación que ha sido descrita en la literatura acompañada de un descenso en los niveles de IGFs circulantes es la diabetes (39). El interés de este hecho es grande, ya que

en la diabetes, por la deficiencia de insulina, se produce una especie de subnutrición celular en los tejidos. Por otra parte los estudios de las alteraciones de IGFs y sus proteínas ligadoras en periodo fetal (en el cual, como se ha dicho, su secreción no depende de GH) o en etapa neonatal, en la cual los niveles de GH se encuentran muy disminuidos por efecto de la subnutrición (258), permitirá conocer la modulación que en dicha secreción ejercen la insulina y los nutrientes.

En este trabajo se estudian, creemos, por primera vez, los niveles de IGFs y sus proteínas ligadoras en periodo fetal y neonatal en un mismo modelo de subnutrición que se comienza el día 16 de gestación. Conviene resaltar que esta etapa de comienzo es en sí misma importante si se considera el papel de la insulina y los IGFs en la regulación del crecimiento del embrión y el feto. Así mismo, los resultados obtenidos en el modelo de subnutrición en etapa fetal y lactante se comparan con los que se obtienen en un modelo de diabetes provocado inyectando STZ intraperitonealmente a la ratas gestantes el día 16 y a neonatos el día 4 de vida postnatal. En ambos modelos se determinaron la glucemia, los niveles de insulina (por RIA), así como IGF-I (por RIA) e IGF-II (por RRA) en suero. Las proteínas ligadoras en suero se analizaron mediante "Western ligand blot" y "Western immunoblot". A fin de obtener una aproximación del papel de los receptores en los cambios observados en los niveles de IGFs con ambos modelos, efectuamos estudios de ligamiento de IGF-I y II en preparaciones de membrana plasmática de diversos tejidos.

La finalidad de este trabajo es doble. Por una parte se pretende aportar conocimientos acerca de hasta qué punto los nutrientes y la insulina modulan la secreción de IGFs en etapas inmaduras. Por otra parte se trata de establecer la correlación, si existe, entre estos factores y sus proteínas ligadoras y crecimiento. Para valorar mejor la influencia de la insulina y los nutrientes en las alteraciones encontradas en los estudios anteriores, se realizaron estudios de rehabilitación tanto en ratas neonatales como adultas. En una serie de experimentos se realimentaron ratas sometidas a subnutrición desde la etapa gestante, y en otra se administró insulina a ratas a las que previamente se les había provocado un estado de diabetes por STZ. Finalmente, en la misma línea, y con el propósito de verificar si los nutrientes son realmente más decisivos que la insulina en la regulación de los cambios que se producen en IGF-I en la subnutrición y la diabetes, se efectuó un estudio combinado de ambas situaciones, diabetes y subnutrición, en ratas adultas. En todos estos experimentos se determinaron la glucemia, los niveles séricos de insulina e IGFs, y se analizaron las proteínas ligadoras del suero.

Estos estudios, además de la aportación de conocimientos básicos en etapas de desarrollo, tienen un gran interés en clínica. Por una parte permitirán establecer las condiciones ambientales —nutricionales— idóneas de la madre gestante y neonato en momentos de desarrollo. Por otra parte el conocimiento de los mecanismos por los cuales los nutrientes controlan la síntesis de IGFs y regulan su transporte a los tejidos (a través

de las IGFbps) permitirá en el futuro el empleo de dichos factores en la terapéutica de estados catabólicos diversos.

## **2. MATERIAL Y METODOS**

## 2. MATERIAL Y METODOS

### 2.1. Animales y tratamientos

A lo largo del presente trabajo se han utilizado ratas de raza Wistar obtenidas del propio criadero del Instituto de Bioquímica, ubicado en el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular II de la Facultad de Farmacia (Univ. Complutense). Ello ha permitido ejercer un estricto control de las condiciones nutricionales y generales de estas ratas, tanto en las etapas gestacional y lactante como, posteriormente, en la adulta.

En el mencionado criadero existe un acondicionador de temperatura que mantiene esta variable ambiental constantemente entre 22 y 24 °C. Por otra parte, gracias a un reloj controlador, las ratas están sometidas a un ciclo de luz/oscuridad automático, iluminándose la estancia a las 7.00 h y oscureciéndose a las 19.00 h.

El inicio de la gestación fue establecido mediante la observación, por frotis, de la presencia de espermatozoides en la vagina de la rata (180-200 g) al día siguiente de su apareamiento con el macho (300-400 g); dicha condición se confirmó a los 14 días por palpación abdominal. El día del nacimiento (día 0 de vida) todas las camadas se igualaron a 8 crías, con un número equivalente de machos y hembras. Las ratas se destetaron el día 25 de vida y fueron agrupadas por sexos en jaulas con 4 animales.

#### 2.1.1. Composición de la dieta general.

El alimento suministrado fue la dieta de mantenimiento A.04 de Panlab S.L. (Barcelona); se presenta en forma de porciones prensadas cuya composición, en gramos por ciento, es la siguiente:

Proteína bruta.....	17,62
Materias grasas brutas.....	2,50
Celulosa bruta.....	4,05
Cenizas brutas.....	4,38
Almidón.....	43,30
Calcio.....	0,66
Fósforo.....	0,49
Sodio.....	0,14
Humedad.....	10,54

El resto de los ingredientes está constituido por una mezcla de minerales y vitaminas.



Considerando las cifras convencionales de equivalencia calórica de los tres principios inmediatos (4,1 kcal/g para los glúcidos y prótidos y 9,0 kcal/g para los lípidos) la mezcla descrita posee un valor de 2,73 kcal/g.

### **2.1.2. Modelo de subnutrición desde la etapa gestante.**

En función de la cantidad de alimento consumido por las ratas se definieron dos grupos experimentales:

#### **a) *Ratas control***

Las ratas control procedían de progenitores alimentados *ad libitum* en todo momento con el pienso descrito. Las controles-lactantes fueron amamantadas por ratas que dispusieron siempre de pienso libremente; las controles-adultas recibieron ellas mismas este tipo de dieta a partir del destete.

#### **b) *Ratas subnutridas***

El modelo de subnutrición consistió en una limitación de un 30 a 40% en la cantidad de pienso suministrado diariamente a las ratas (278); en consecuencia, la subnutrición derivó de una deficiencia dietética proteico-energética. La limitación se inició durante la última fase de la gestación, continuándose a lo largo de la lactancia y tras el destete. Por lo tanto, durante las dos primeras etapas mencionadas la restricción se aplicó a la gestante y a la madre, y así la deficiencia nutricional en el feto y en la rata lactante fue indirecta, resultante de la carencia materna; a partir del destete, una vez separadas las crías de la madre, la restricción se continuó directamente en éstas.

La cantidad de pienso suministrada varió a lo largo de las tres etapas que se están considerando —gestación, lactancia y período posterior al destete—, concretándose en la siguiente pauta:

1.- *Gestación*. A partir del día 14 o 16 de la gestación, las ratas preñadas recibieron diariamente 10 g de pienso, hasta el día del parto.

2.- *Lactancia*. Durante la 1ª, 2ª y 3ª semana de la lactancia se proporcionó a las ratas madres, respectivamente, 15, 20 y 25 g diarios de pienso; durante los tres días siguientes (los inmediatamente previos al destete) se les suministró 30 g por día y camada.

3.- *Etapa posterior al destete*. A partir del día 25, en el que las crías fueron separadas de la madre, y hasta la edad adulta, se fijó una pauta de subnutrición mediante la cual las ratas recibieron el 30-40% de la comida ingerida *ad libitum* por las controles.

### **2.1.3. Pauta de realimentación.**

#### **2.1.3.1. Ratas neonatales.**

Una camada de ratas de 8 días subnutridas desde el día 16 de gestación recibió pienso *ad libitum* hasta los 14 días. Tanto la subnutrición como la realimentación fueron indirectas, a través de la madre lactante. Las crías fueron sacrificadas por decapitación, recogiendo muestras de sangre y tejidos según se detalla más adelante. También se recogieron muestras de ratas subnutridas y controles alimentadas *ad libitum* de 8 y 14 días de vida.

#### **2.1.3.2. Ratas adultas.**

Se emplearon ratas macho de 75 días de vida. Un grupo de 6 ratas sometidas a subnutrición según el modelo descrito más arriba recibió pienso *ad libitum* durante 6 días. Otro grupo de ratas subnutridas continuó con la pauta de restricción durante el mismo periodo de tiempo. Finalmente, como control se tomó un grupo de ratas que no habían sido sometidas a ningún tipo de restricción dietética a lo largo de su vida. Transcurridos los 6 días los animales fueron sacrificados por decapitación, recogiendo muestras de sangre y tejidos según se detalla más adelante.

### **2.1.4. Modelo de diabetes por estreptozotocina.**

Provocamos un cuadro de diabetes mellitus en la rata mediante la administración por vía intraperitoneal de una solución de estreptozotocina (STZ) (amablemente suministrada por Upjohn Farmoquímica, S.A., Madrid) en tampón citrato 0,05 M pH 4,5. La comprobación del estado de diabetes se llevó a cabo mediante la determinación de la glucemia como se detalla más adelante. Posteriormente se corroboró con la medición de la concentración sérica de insulina.

Las dosis administradas fueron las siguientes: rata gestante 4,5 mg/100 g peso el día 14 o 16 de gestación; neonatos y adultos 7 mg/100 g peso.

#### **2.1.5. Pauta de tratamiento sustitutivo con insulina.**

En un experimento previo se sometieron a prueba tres tipos de insulina de acción lenta, todas ellas suministradas amablemente por Novo Nordisk Pharma S.A. (Madrid). Estas insulinas fueron Ultratard® HM (humana monocomponente cristalina), Mixtard® HM 30/70 (humana monocomponente, 30% cristalina y 70% isofánica) y Lente® (monocomponente de páncreas porcino y bovino). De todas ellas la única que se mostró

eficaz para normalizar la glucemia en ratas adultas tratadas con STZ fue la insulina Lente<sup>®</sup>. Esta insulina es una mezcla constituida por un 30% de insulina de páncreas porcino en estado amorfo y un 70% de insulina de páncreas bovino en forma cristalina, y según las especificaciones del fabricante su acción comienza a las 2,5 horas, alcanza un máximo de 7 a 15 horas y finaliza a las 24 horas.

La insulina se administró por vía subcutánea repartida en dos dosis, una por la mañana (9.00 h) y otra por la tarde (18.00 h). Las dosis administradas y la pauta concreta de tratamiento se determinaron previamente por tanteo, considerándose adecuada la dosis capaz de mantener la glucemia en un rango normal (80-120 mg/100 ml); estas dosis se especifican más adelante.

#### **2.1.5.1. Ratas neonatales.**

Se emplearon tres camadas de ratas lactantes de 14 días de edad; dos de ellas recibieron STZ y la tercera sirvió como control. Al tercer día se comprobó el estado de diabetes en los animales inyectados, recibiendo una de las camadas tratamiento con insulina por vía subcutánea a razón de 3 UI/100 g peso/día durante 5 días. Esta dosis se repartió en dos mitades, una por la mañana y otra por la tarde. Se efectuaron mediciones de la glucemia diariamente, antes de administrar la insulina, para comprobar la evolución del tratamiento. Al final del tratamiento los animales fueron sacrificados por decapitación, recogiendo muestras de sangre y tejidos según se detalla más adelante.

#### **2.1.5.2. Ratas adultas.**

Se emplearon ratas macho con un peso corporal en un rango de 180 a 220 g. Se establecieron tres grupos de 6 animales cada uno; dos grupos recibieron STZ y un tercero sirvió como control. El procedimiento de comprobación del estado de diabetes, al tercer día de la inyección de STZ, así como la pauta de tratamiento, fueron los mismos que para las ratas neonatales. Al final del tratamiento los animales fueron sacrificados por decapitación, recogiendo muestras de sangre y tejidos según se detalla más adelante.

#### **2.1.6. Realimentación y tratamiento con insulina de ratas adultas subnutridas y diabéticas.**

Se utilizaron varias poblaciones de ratas macho normales de un rango de peso corporal de 180 a 220 g. Las poblaciones de ratas subnutridas (poblaciones S) recibieron 7 g de alimento/día (repartidos en dos mitades, una por la mañana y la otra por la tarde) durante 7 días, en que a 3 de estas poblaciones se les inyectó intraperitonealmente una dosis de STZ de 7 mg/100 g de peso.

A los tres días de la administración de la STZ (día 10 del experimento) se determinó la glucemia y se sacrificó una de estas poblaciones (ratas subnutridas diabéticas, población SD); de las otras dos, una recibió insulina (1 UI/100 g peso/día) por vía subcutánea y continuó siendo subnutrida (población SD+I), mientras que la otra recibió insulina (3 UI/100 g peso/día) por vía subcutánea y alimento *ad libitum* (población RD+I). Se determinó diariamente la glucemia antes de administrar la insulina a fin de comprobar la evolución del tratamiento. El tratamiento con insulina duró 5 días, al término de los cuales (día 14 del experimento) los animales fueron sacrificados por decapitación, recogiendo muestras de sangre y tejidos según se detalla más adelante. Se obtuvieron muestras también de ratas subnutridas (poblaciones S) y controles alimentadas *ad libitum* (poblaciones C) de los días 10 y 14. No hubo supervivencia de ratas subnutridas diabéticas hasta el día 14 del experimento.

### **2.1.7. Recogida de muestras.**

#### **2.1.7.1. Recogida y conservación de muestras de rata neonatal y adulta.**

Se obtuvieron muestras de sangre del tronco tras decapitación del animal. Los sacrificios se efectuaron generalmente entre las 9 y las 11 horas. La sangre se recogió en tubos Eppendorf y se dejó coagular en hielo durante 30 minutos. Transcurrido este tiempo los tubos se centrifugaron durante 5 minutos a 12.000 rpm (Microfuge 11, Beckman); el suero se trasvasó a otra serie de tubos Eppendorf, que se conservaron a -80 °C hasta su análisis.

Inmediatamente después de la decapitación se extrajeron las muestras de tejidos (hígado y cerebro), se sumergieron en nitrógeno líquido y posteriormente se conservaron a -80 °C hasta su procesamiento posterior.

#### **2.1.7.2. Recogida y conservación de muestras de fetos y gestantes.**

La recogida de muestras de suero y tejidos de fetos se llevó a cabo bajo anestesia por éter de la rata gestante. Una vez anestesiada la rata se efectuó una incisión abdominal y tras abrir los cuernos uterino se expusieron los fetos uno a uno. Sin seccionar el cordón umbilical se efectuó una incisión en un costado (fetos de 17 y 18 días) o en una axila (fetos de 19 y 21 días) y mediante una pipeta Pasteur se aspiró la sangre y se trasvasó a tubos Eppendorf. A fin de obtener suficiente cantidad de muestra para varias determinaciones, fue necesario reunir en uno o dos tubos la sangre de los fetos de una camada a 17 y 18 días; a 19 y 21 días se reunió la sangre de 2 o 3 fetos. El procesamiento posterior de la sangre fue idéntico al que se siguió con la de neonatos y adultos. Finalmente, se seccionó el cordón umbilical y se extrajeron rápidamente el hígado, el cerebro y la placenta, que

se sumergieron inmediatamente en nitrógeno líquido y se conservaron posteriormente a -80 °C.

Terminada la recogida de muestras fetales se obtuvo sangre de la rata gestante por punción cardíaca.

#### **2.1.7.3. Preparación de suero patrón de rata.**

El suero patrón de rata es un "pool" de suero de ratas macho adultas que empleamos para la puesta a punto de algunas técnicas. Para prepararlo recolectamos la sangre del tronco de 35 ratas macho adultas de  $289,7 \pm 32,3$  g de peso, sacrificadas por decapitación. Esta sangre se dejó coagular durante 30 minutos en hielo y a continuación se centrifugaron los tubos durante 10 minutos a 5000 rpm (Labofuge A, Heraeus). Los sueros se reunieron en un recipiente y el "pool" resultante se dividió en alícuotas que se conservaron a -80 °C.

#### **2.1.7.4. Recogida y conservación de las muestras de hígado de rata adulta para RRA.**

Para la preparación de membrana particulada de hígado de rata se sacrificaron 20 ratas macho adultas de  $354,0 \pm 26,0$  g de peso. Inmediatamente se extrajo el hígado, se escurrió en papel de filtro y se sumergió en nitrógeno líquido. Se obtuvieron así 210 g de hígado que se conservaron a -80 °C hasta el momento de su procesamiento.

#### **2.1.7.5. Otras muestras.**

El suero humano normal empleado en la puesta a punto de algunos métodos fue suministrado amablemente por la Escuela de Análisis Clínicos de la Facultad de Farmacia.

El suero de conejo normal empleado como control en el "Western immunoblot" de IGFBPs fue proporcionado por el Departamento de Parasitología de la Facultad de Farmacia.

### **2.2. Métodos de separación de las IGFBPs**

Se evaluaron tres procedimientos de separación de las IGFBPs del suero previamente a la determinación de la concentración de IGF-I y II mediante RIA y RRA, respectivamente. Estos procedimientos son la filtración en gel en medio ácido (267), la extracción en ácido-etanol con crioprecipitación (279) y la extracción en ácido fórmico-acetona (271).

que en medio ácido (condiciones en que empleamos las columnas) se adhiere al Sephadex<sup>®</sup> y a su vez los IGFs se adhieren al azul de dextrano. En consecuencia, se empleó albúmina sérica bovina (BSA), que por su peso molecular (67 kDa) aparece en un volumen de elución inferior tanto al de los IGFs como al de sus proteínas ligadoras. Para determinar el volumen total de la columna empleamos dicromato potásico, que tiene un peso molecular de 294,2 Da. Para la calibración empleamos también insulina, que por su peso molecular (~ 6000 Da) eluye entre la albúmina y el dicromato potásico).

Se preparó una solución constituida por BSA 10 mg/ml y 4 UI de insulina/ml en eluyente, a la que añadimos unas gotas de solución de dicromato potásico en agua destilada. Se aplicó a cada columna una alícuota de esta solución y se filtró a un flujo aproximado de 4 ml/hora, recogiendo fracciones de unos 3 ml. A continuación, en un espectrofotómetro, se leyó la absorbancia a 280 nm de cada una de las fracciones frente al eluyente como blanco.

#### **2.2.1.3.2. Calibración mediante RIA.**

Para determinar con exactitud en qué fracciones eluyen tanto los IGFs como sus proteínas ligadoras una vez separadas, se filtró una alícuota de 1 ml de suero patrón y se efectuó un RIA con cada una de las fracciones una vez liofilizadas y reconstituidas.

La filtración se efectuó en las mismas condiciones empleadas después con las muestras de suero. Se recogieron fracciones de aproximadamente 2 ml; el contenido de cada fracción, fue trasvasado a viales de vidrio para su liofilización, y los viales con el liofilizado se conservaron a -20 °C hasta su análisis. Posteriormente cada fracción se resuspendió en tampón de RIA y se analizó por duplicado según se detalla en 2.4.2. En un mismo ensayo se analizaron las fracciones de las tres columnas.

En la figura 2.1. se muestra el resultado de la calibración mediante RIA de una columna de Sephadex<sup>®</sup> G-50. Este resultado es representativo de las tres columnas que empleamos para la filtración de los sueros. En la parte superior de la gráfica se señalan los volúmenes de elución de BSA ( $V_0$ ), insulina ( $V_{ins}$ ) y dicromato potásico ( $V_d$ ) determinados previamente por espectrofotometría. El perfil de elución del suero patrón muestra claramente dos picos de inmunorreactividad de IGF, el primero de los cuales corresponde a las proteínas ligadoras de IGF (IGFBP) y el segundo a IGF. En las tres columnas IGF eluye con un  $K_{av}$  de 0,22. El hecho de que aparezca un pico de inmunorreactividad de IGF en una serie de fracciones en las que estos péptidos están ausentes (pico IGFBP) da idea del grado de interferencia de las proteínas ligadoras al competir con el antisuero por su unión al radioligando.

De acuerdo con este resultado, de todas las muestras que sometimos a filtración en gel hemos reunido las fracciones 41 a 57 para su posterior procesamiento.

#### **2.2.1.4. Filtración de los sueros.**

Primeramente se diluye la muestra de suero en la proporción 1:1 en una solución de ácido acético 2 M en agua destilada, de modo que la concentración final de ácido acético en la muestra es 1 M; esta mezcla se deja durante una hora a temperatura ambiente con el objeto de permitir la disociación de los complejos IGF-proteínas ligadoras.

A continuación se aplica la muestra a la columna y se somete a filtración a un flujo aproximado de 4 ml/hora, empleando como eluyente una solución de ácido acético 1,0 M y NaCl 0,02 M en agua destilada. Las fracciones correspondientes a IGF se reúnen y se liofilizan. El liofilizado se resuspende en tampón de RIA y se reparte en alícuotas, que se conservan a -20 °C hasta su análisis.

#### **2.2.1.5. Recuperación de IGF filtrado.**

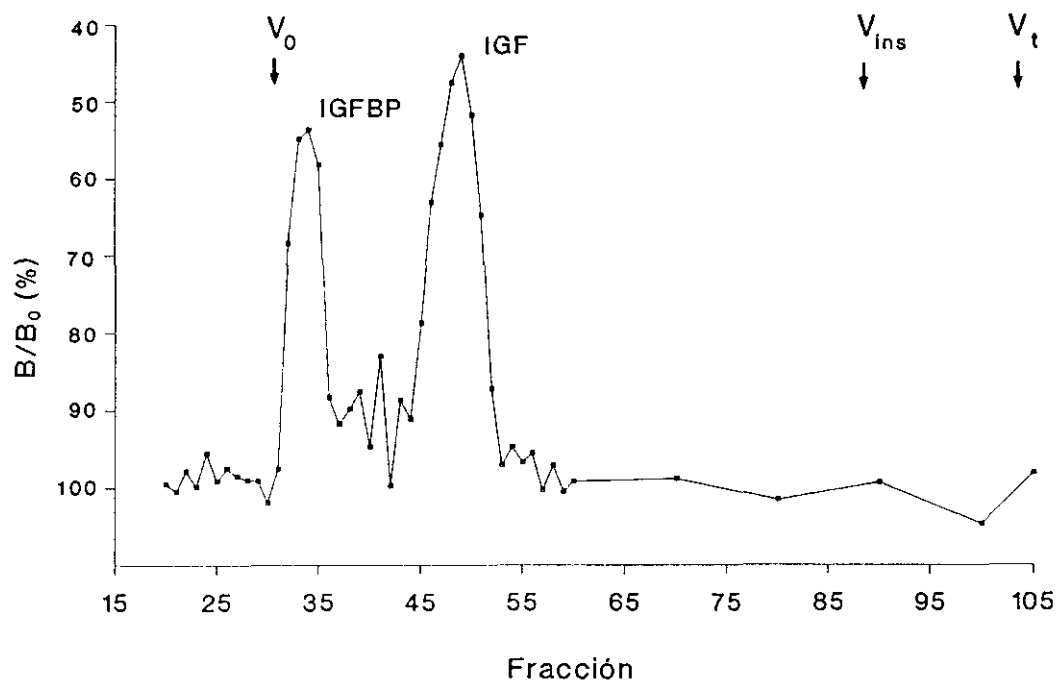
La finalidad de esta prueba es evaluar la proporción de IGF que se recupera después el proceso de filtración en gel y liofilización. Empleamos para ello muestras de suero patrón a las que habíamos añadido una alícuota de  $^{125}\text{I}$ -IGF-I recién marcado de aproximadamente 100.000 cpm. Tras someter las muestras a todo el proceso descrito anteriormente, se contó una alícuota del extracto resultante. El tanto por ciento de IGF recuperado se calculó como la relación entre las cpm recuperadas y las cpm aplicadas a la columna (corregidas según la tasa de desintegración del isótopo). El porcentaje de recuperación obtenido en nuestras columnas fue del  $75,7 \pm 6,4\%$  ( $n = 6$ ). El coeficiente de variación intraensayo para este procedimiento fue de  $5,4\%$  ( $n = 6$ ).

#### **2.2.2. Extracción en ácido fórmico-acetona.**

##### **2.2.2.1. Procedimiento.**

La extracción en ácido fórmico-acetona se lleva a cabo en tubos de microcentrífuga. A cada muestra de suero se le añade una alícuota de una solución de ácido fórmico 8,0 M con Tween-20 al 0,5% (v/v) preparada extemporáneamente. Se agitan los tubos y a continuación se añade acetona, se tapan y se agitan nuevamente. Inmediatamente se centrifugan durante 15 minutos a  $3500 \times g$  a 4 °C. Los sobrenadantes se trasvasan a otra serie de tubos y finalmente se diluyen en tampón de RIA para su análisis.

Tanto el precipitado como el extracto de cada muestra se conservan a -20 °C para el posterior análisis de las proteínas ligadoras de IGF mediante "Western ligand blot".



**Figura 2.1.** Calibración de una columna de Sephadex® G-50 mediante radioinmunoanálisis. La muestra empleada fue una alícuota de 1 ml de suero patrón de rata. Se determinó el tanto por ciento de ligamiento específico de IGF-I de cada fracción. En la parte superior se indican los volúmenes de elución de BSA ( $V_0$ ), insulina ( $V_{ins}$ ) y dicromato potásico ( $V_t$ ).



#### **2.2.2.2. Recuperación de IGF en el extracto.**

El porcentaje de recuperación de una alícuota de aproximadamente 10.000 cpm de  $^{125}\text{I}$ -IGF-I añadida a una muestra de suero patrón sometida a este procedimiento de extracción fue del  $80,1 \pm 2,0\%$ , con un coeficiente de variación de 2,5% ( $n = 8$ ).

#### **2.2.3. Extracción en ácido-etanol con crioprecipitación.**

##### **2.2.3.1. Procedimiento.**

La extracción en ácido-etanol se lleva a cabo en tubos de microcentrífuga. A cada muestra de suero se le añade mezcla ácido-etanol (ácido clorhídrico 2 M y etanol absoluto en la proporción 12,5:87,5 v/v), se agitan cuidadosamente los tubos y se dejan en reposo durante 30 minutos a temperatura ambiente. Se forma un ligero precipitado. A continuación se centrifugan durante 30 minutos a  $3000 \times g$  a 4 °C, los sobrenadantes se transfieren a otra serie de tubos limpios y los precipitados se conservan. Se añade entonces Tris base 0,86 M a los tubos con el sobrenadante, se agitan cuidadosamente y se guardan en el congelador (-20 °C) durante 1 hora. Transcurrido este tiempo se centrifugan durante 30 minutos a  $3000 \times g$  a 4 °C, el sobrenadante se transvasa a otra serie de tubos limpios y el segundo precipitado se conserva. Se deja entonces que los extractos tomen la temperatura ambiente y finalmente se diluyen, para su análisis, en mezcla P/AE/Tris (constituida por tampón fosfato 0,01 M, mezcla ácido-etanol y Tris base 0,86 M en la proporción 1:4:2 en volumen).

Tanto los precipitados como el extracto de cada muestra se conservan a -20 °C para el posterior análisis de las proteínas ligadoras de IGF mediante "Western ligand blot".

##### **2.2.3.2. Recuperación de IGF en el extracto.**

El porcentaje de recuperación de una alícuota de aproximadamente 10.000 cpm de  $^{125}\text{I}$ -IGF-I añadida a una muestra de suero patrón sometida a este procedimiento de extracción fue del  $78,6 \pm 1,3\%$ , con un coeficiente de variación de 1,7% ( $n = 8$ ).

### **2.3. Marcaje radiactivo de IGF-I y II**

#### **2.3.1. Principio.**

Nos propusimos establecer un protocolo de marcaje que nos permitiera obtener péptidos con suficiente radiactividad específica, y a la vez sin merma de la actividad biológica, como para proporcionar una adecuada sensibilidad a los métodos de cuantificación de IGF en nuestras muestras. Para el marcaje radiactivo de IGFs se empleó

una modificación del método de la cloramina-T (280). Este método es, con mucho, el más ampliamente utilizado para el marcaje de pequeñas cantidades de proteína con una alta radiactividad específica para su uso como radioligando en el radioanálisis competitivo.

La reacción química que tiene lugar es la oxidación del  $\text{Na}^{125}\text{I}$  en presencia de una proteína que contiene residuos de tirosina, con la subsiguiente incorporación del radioyodo en estos residuos. La cloramina-T es la sal sódica del derivado N-monocloro de la *p*-tolueno sulfonamida. En solución acuosa se degrada lentamente formando ácido hipocloroso; es, por tanto, un agente oxidante. En presencia de cloramina-T en condiciones ligeramente alcalinas (pH 7,5) el NaI es oxidado, formando yodo catiónico,  $\text{I}^+$ , el cual reacciona con el anillo fenólico de la cadena lateral de la tirosina, incorporándose en posición orto respecto del grupo hidroxilo.

El proceso se detiene por dilución de la mezcla de reacción en presencia de una alta concentración de BSA; con ello se alteran las condiciones de la reacción y se desvía la incorporación de  $^{125}\text{I}$  hacia la BSA, proteína fácil de separar posteriormente de la mezcla por su elevado peso molecular respecto al IGF.

El siguiente paso es la separación de la proteína marcada del yodo radiactivo no incorporado, así como de la albúmina que haya podido resultar marcada. Esto se consigue fácilmente mediante filtración en gel (Sephadex® G-50).

### **2.3.2. Material y reactivos.**

Las hormonas que empleamos en los marcajes son rhIGF-I y rhIGF-II (IGF-I y II humano recombinante) de Boehringer Mannheim (Leverkusen, Alemania), en forma de liofilizado. Los mismos péptidos se emplean para la elaboración de la curva patrón en el RIA y en el RRA. El liofilizado se reconstituye con ácido acético 0,1 M; se toma una alícuota y se deseca en un tubo de ultracentrífuga.

El yodo radiactivo se obtuvo de Amersham (Amersham Ibérica S.A., Madrid). Se presenta en forma de  $\text{Na}^{125}\text{I}$  a una concentración de 100 mCi/ml.

Para la filtración en gel se prepararon columnas de Sephadex® G-50 fine equilibradas antes del marcaje, bien con tampón fosfato 0,03 M, BSA al 0,25 % (p/v) y azida de sodio al 0,02 % (p/v) (para el marcaje de IGF-I), bien con ácido acético 1,0 M y BSA al 0,25 % (p/v) (para el marcaje de IGF-II).

### 2.3.3. Procedimiento.

Todo el proceso de marcaje tiene lugar a temperatura ambiente. La reacción se lleva a cabo en el mismo tubo de ultracentrífuga en el que se ha desecado el péptido, el cual se resuspende en tampón fosfato 0,5 M. A continuación se añade la solución de  $\text{Na}^{125}\text{I}$  y se agita. Se añade entonces la solución de cloramina-T (0,25 mg/ml en tampón fosfato 0,01 M) recién preparada y se agita el tubo durante 30 segundos, tiempo en el que se produce la reacción de yodación del péptido.

Para detener la reacción se añade:

- En el marcaje de IGF-I, una alícuota de solución de BSA al 5% (p/v) en tampón fosfato 0,03 M.
- En el marcaje de IGF-II, una alícuota de solución de BSA al 5% (p/v) en ácido acético 1,0 M.

Se agita suavemente y todo el volumen se transfiere a la columna de Sephadex\* previamente equilibrada con el tampón correspondiente. Este mismo tampón se emplea para la filtración, a un flujo aproximado de 30 ml/hora.

Se recogen fracciones de 1 ml, y conforme van eluyendo se cuenta una alícuota de cada una de ellas en el contador de radiactividad gamma Packard Autogamma 5650. A continuación se representa el perfil de elución y se eligen las fracciones de interés, las cuales se conservan congeladas a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  divididas en alícuotas.

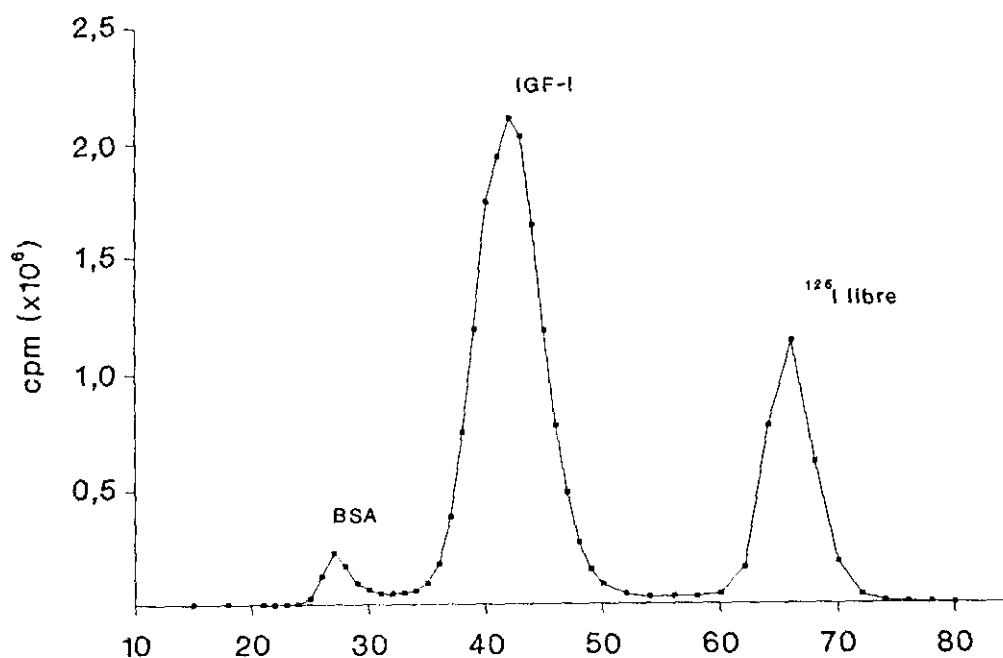
### 2.3.4. Cálculo del rendimiento y la actividad específica.

Por rendimiento se entiende el tanto por ciento del total de radiactividad presente en el tubo de reacción que se incorpora al péptido, y se calcula como el cociente entre las cpm en el pico de IGF-I o IGF-II y las cpm totales eluidas de la columna. A continuación se calcula la radiactividad incorporada al polipéptido, que se obtiene de multiplicar el rendimiento por la radiactividad añadida al tubo de reacción, corregida a la fecha del marcaje. Finalmente la radiactividad incorporada dividida por la masa de polipéptido utilizada en el marcaje nos da la actividad específica, que expresamos en  $\mu\text{Ci}/\mu\text{g}$ .

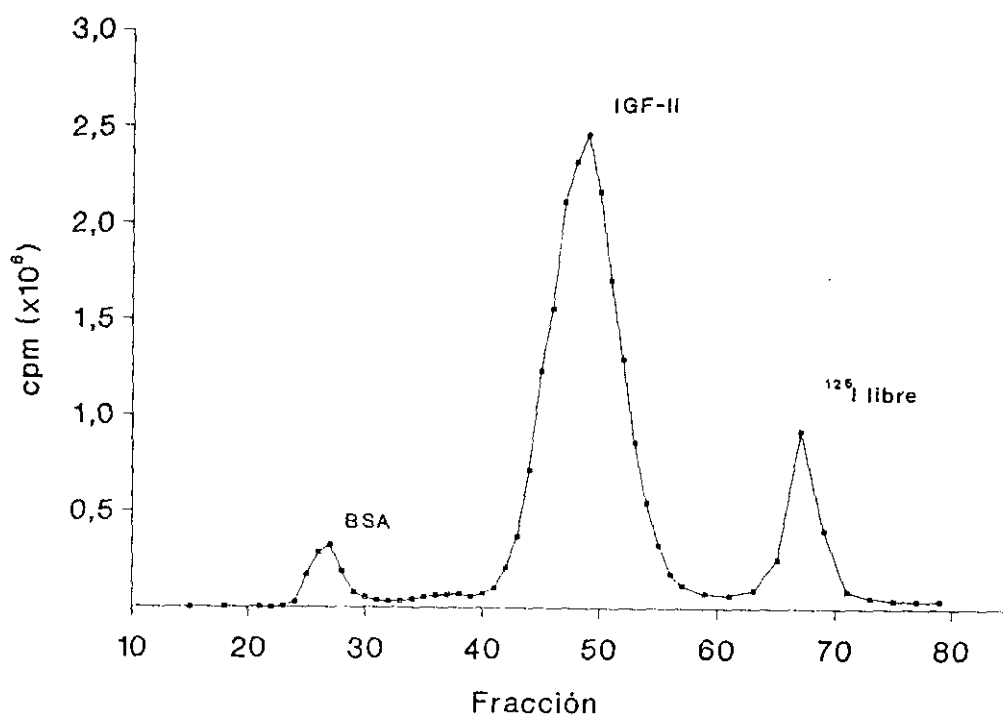
### 2.3.5. Perfil de elución de radiactividad tras el marcaje radiactivo de IGFs.

El perfil de elución obtenido tras el marcaje de IGF-I por el método de la cloramina-T (Fig. 2.2.A) muestra tres picos de radiactividad. El primero de ellos corresponde a BSA que resulta radioyodada en el momento de detener la reacción. El siguiente pico es el de

### A. Marcaje radiactivo de IGF-I

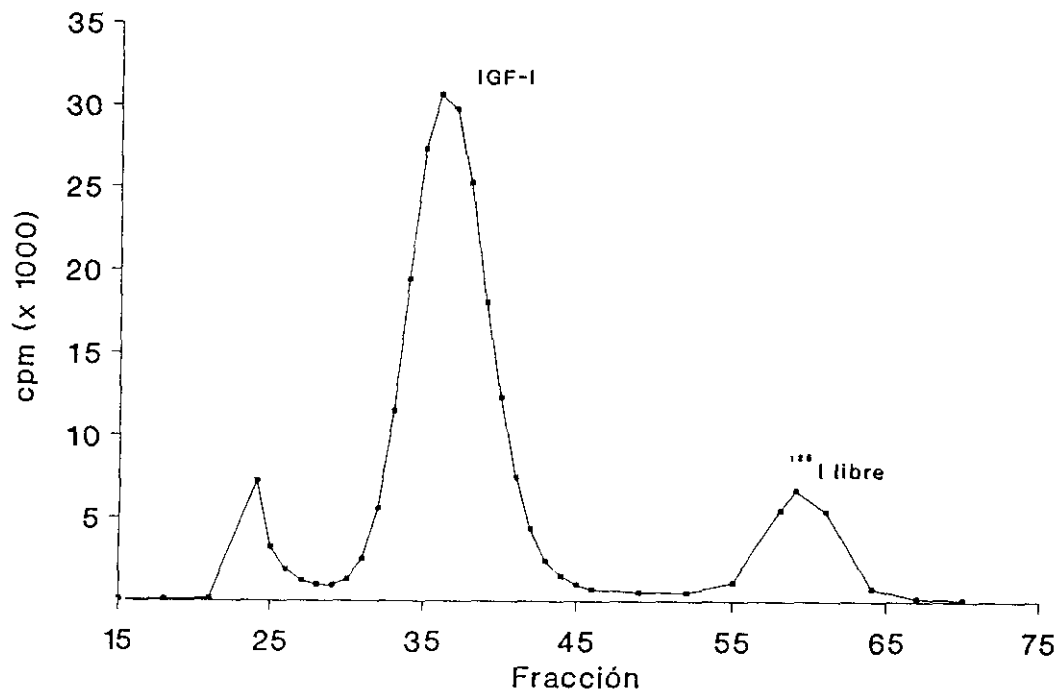


### B. Marcaje radiactivo de IGF-II



**Figura 2.2.** Perfil de elución de radiactividad en columna de Sephadex® G-50 tras el marcaje de IGF-I (A) o IGF-II (B) con  $^{125}\text{I}$  por un método modificado de la cloramina-T.

### Repurificación de IGF-I



**Figura 2.3.** Perfil de elución de radiactividad en columna de Sephadex® G-50 tras la repurificación de IGF-I previamente marcado con  $^{125}\text{I}$ .

elución de la hormona marcada, apareciendo en último lugar el yodo libre que no ha llegado a reaccionar ni con la hormona ni con la BSA. El rendimiento obtenido en los marcajes de IGF-I osciló entre el 34,0 y el 73,9%. El péptido marcado según nuestro procedimiento tenía una actividad específica de 90-150  $\mu\text{Ci}/\mu\text{g}$ .

De manera análoga al marcaje de IGF-I, obtenemos en el marcaje de IGF-II también un perfil de elución (Fig. 2.2.B) con tres picos de radiactividad, correspondientes a BSA e IGF-II marcados y a yodo libre. El rendimiento obtenido en los marcajes de IGF-II osciló entre el 40,0 y el 77,4%, alcanzando el péptido una actividad específica de 80-175  $\mu\text{Ci}/\mu\text{g}$ .

### **2.3.6. Repurificación del IGF-I marcado.**

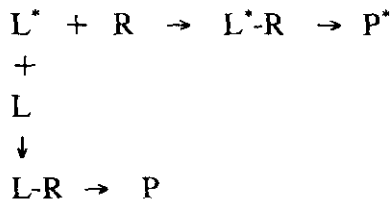
El IGF-I marcado conserva su actividad biológica (tanto en los RIAs como en los experimentos de "Western ligand blot") durante más de dos meses. No obstante, conforme transcurre el tiempo se produce un aumento del ligamiento inespecífico en el RIA. Para obviar este inconveniente efectuamos la repurificación de algunas fracciones resultantes del marcaje. Con la repurificación se consigue separar la hormona marcada íntegra de la deteriorada por la radiactividad y del yodo radiactivo desprendido del péptido.

La repurificación se llevó a cabo en las mismas condiciones en que se efectúa la purificación tras el marcaje. La repurificación de una de las fracciones de  $^{125}\text{I}$ -IGF-I un mes después del marcaje (generalmente efectuamos la repurificación a las cuatro semanas del marcaje) proporcionó el perfil de elución que se muestra en la figura 2.3. Se aprecian claramente tres picos, el mayor de los cuales corresponde a IGF-I marcado. El yodo libre, desprendido de las moléculas de IGF-I marcado, eluye en último lugar, y supone un 15,2% de la radiactividad total eluida. El primer pico (5,5% de la radiactividad total) se debe muy probablemente a polímeros de IGF-I.

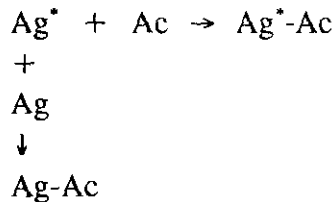
## **2.4. Determinación de la concentración sérica de hormonas mediante RIA**

### **2.4.1. Principio del método.**

El RIA es un caso particular del radioanálisis competitivo, el cual se basa en una reacción de competición entre un ligando determinado (L) y el mismo ligando marcado radiactivamente (L\*) por la unión a un receptor específico (R). El grado de competición, y por tanto la concentración, del ligando que se quiere valorar, puede determinarse a partir de los cambios en la concentración de ligando marcado libre o de complejo ligando marcado-receptor, o bien, cuando el receptor es una enzima, en la inhibición de la formación de un producto marcado radiactivamente (P\*):



En el caso concreto del RIA la competición se establece entre un antígeno marcado (en nuestro caso una hormona, IGF-I) y el mismo no marcado ("frío") por la unión a un anticuerpo específico, tal como se esquematiza a continuación:



Esta reacción de competición tiene lugar durante la incubación de ambos antígenos con el anticuerpo, produciéndose una unión del antígeno marcado al anticuerpo en proporción inversa a la cantidad de antígeno no marcado presente que lo desplaza de la unión.

A continuación se procede a separar el complejo inmunológico formado de la radiactividad libre (es decir, que no forma parte de complejos Ag-Ac) y a valorar la proporción de radiactividad ligada. Por comparación con la radiactividad ligada en presencia de cantidades conocidas y crecientes (curva patrón) de antígeno no marcado puede determinarse la concentración de éste en una solución problema.

Un punto importante es que en el RIA no se requiere la identidad biológica o química entre la sustancia patrón y la que se quiere valorar. La validez del análisis se basa en la identidad inmunorreactiva de patrones y desconocidos en su capacidad para competir con la sustancia marcada.

Para que una sustancia determinada pueda ser valorada mediante RIA han de cumplirse una serie de requisitos:

1. Que la sustancia sea o pueda hacerse inmunogénica, y que se disponga de suficiente cantidad para inducir la producción de anticuerpos específicos contra la misma.

2. Que sea posible marcarla con un isótopo radiactivo de forma que se consiga una alta actividad específica sin merma de su actividad biológica.

3. Que se disponga de un método adecuado de separación de la radiactividad libre de la ligada en forma de complejo Ag-Ac.

#### **2.4.2. RIA de IGF-I.**

##### **2.4.2.1. Material y reactivos para el RIA de IGF-I.**

*Patrón.* La hormona que empleamos como patrón es rhIGF-I (IGF-I humano recombinante) de Boehringer Mannheim, que se presenta en forma de liofilizado. Se obtiene de *E. coli* y presenta una pureza >95%. Esta misma hormona se emplea en los marcajes.

*Tampón de RIA.* Está constituido por tampón fosfato 0,01 M pH 7,5 con NaCl 0,15 M y azida de sodio al 0,02% (p/v). Se le añade BSA al 0,5% (p/v). Este tampón se empleó para diluir el patrón y las muestras (en el caso de muestras filtradas y extraídas en ácido fórmico-acetona), el radioligando y el primer anticuerpo, así como para reconstituir el liofilizado de las muestras sometidas a filtración en gel.

*Radioligando.* Se utilizó  $^{125}\text{I}$ -IGF-I preparado según se detalla en 2.3. Se diluyó en tampón de RIA para dar unas 8000 cpm/tubo.

*Primer anticuerpo.* Empleamos un antisuero policlonal (fracción globulínica) anti-IGF-I obtenido en conejos inmunizados con hIGF-I y el fragmento C-terminal (residuos 5-57). Se adquirió de KabiGen AB (Estocolmo, Suecia) y se presenta en forma de liofilizado. En el análisis se empleó diluido en tampón de RIA a un título de 1:1000; este título se había determinado previamente como se detalla más abajo (2.4.2.2.).

*Segundo anticuerpo.* Utilizamos Pharmacia Decanting Suspension 3 (Pharmacia Diagnostics, Uppsala, Suecia). Se trata de una suspensión de complejos de anticuerpos y microsefara. Los anticuerpos se obtienen de oveja, y precipitan anticuerpos de conejo.

##### **2.4.2.2. Titulación del antisuero anti-IGF-I.**

La titulación del antisuero tiene como finalidad hallar la dilución más adecuada del mismo que, proporcionando una buena sensibilidad al análisis, reduzca al máximo las reacciones cruzadas con sustancias análogas a la que se quiere cuantificar.



Para titular el antisuero se determinó el tanto por ciento de ligamiento máximo (%B/T) que se alcanza con diluciones sucesivas de antisuero. Realizamos la titulación en un rango de diluciones entre 1:400 y 1:12.800, en las mismas condiciones del RIA. A la vista del resultado (Fig. 2.4.), elegimos para el RIA un título de 1:1000, con el cual se alcanzó aproximadamente un 30% de ligamiento total; este título dio lugar a una dilución final del antisuero de 1:3000 en los tubos de reacción del RIA.

#### **2.4.2.3. Propiedades del antisuero anti-IGF-I.**

Para determinar las propiedades cinéticas del antisuero anti-IGF-I empleado en el RIA hicimos un análisis de Scatchard (Ver 2.8.6.) de una curva de desplazamiento de IGF-I en el mismo rango de concentraciones de la curva patrón y en las mismas condiciones que se emplean en el RIA (Fig. 2.5.).

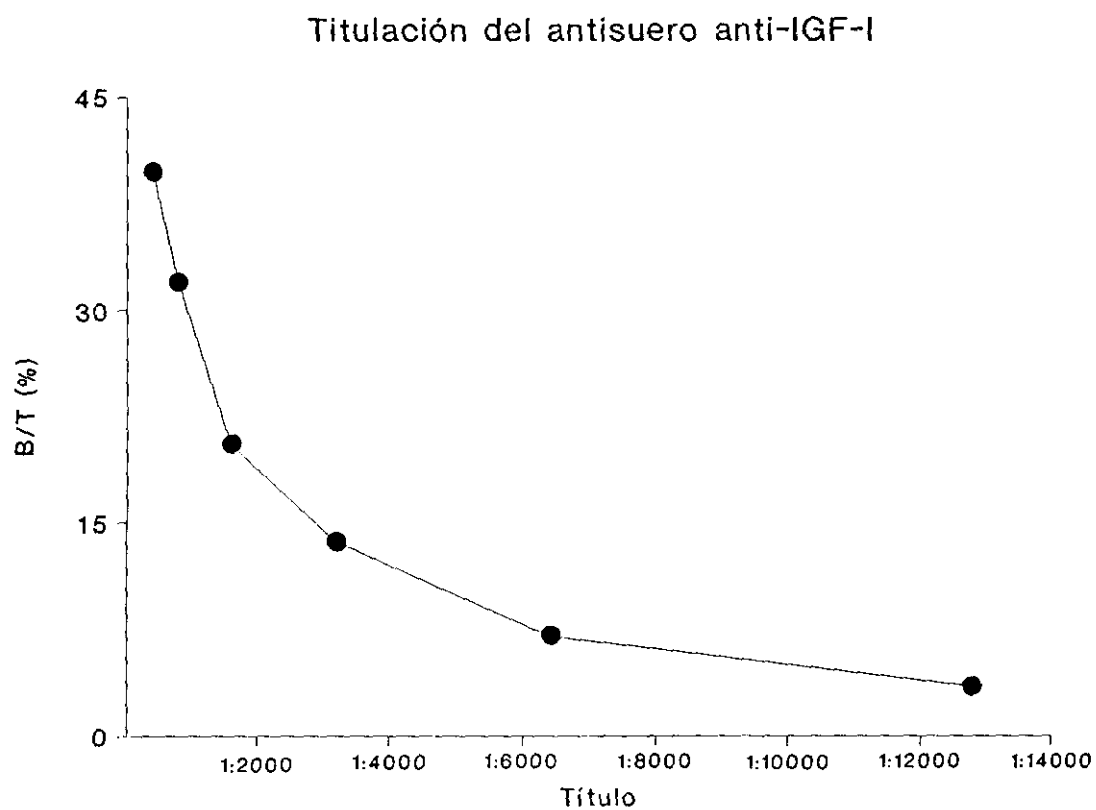
La curva de desplazamiento presenta un trazado sigmoideo característico de las reacciones antígeno-anticuerpo. La representación de Scatchard muestra un trazado curvilíneo, como era de esperar en un antisuero policlonal, constituido por una mezcla de anticuerpos con distinta afinidad por el antígeno. A partir del gráfico se determinaron las constantes de afinidad de los sitios de unión de máxima y mínima afinidad, que fueron, respectivamente  $17,14 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$  y  $0,71 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$ , por tanto de un orden de magnitud similar al de la afinidad de las IGFBPs por IGF (Ver 1.1.3.2.).

#### **2.4.2.4. RIA de IGF-I en muestras filtradas y extraídas en ácido fórmico-acetona.**

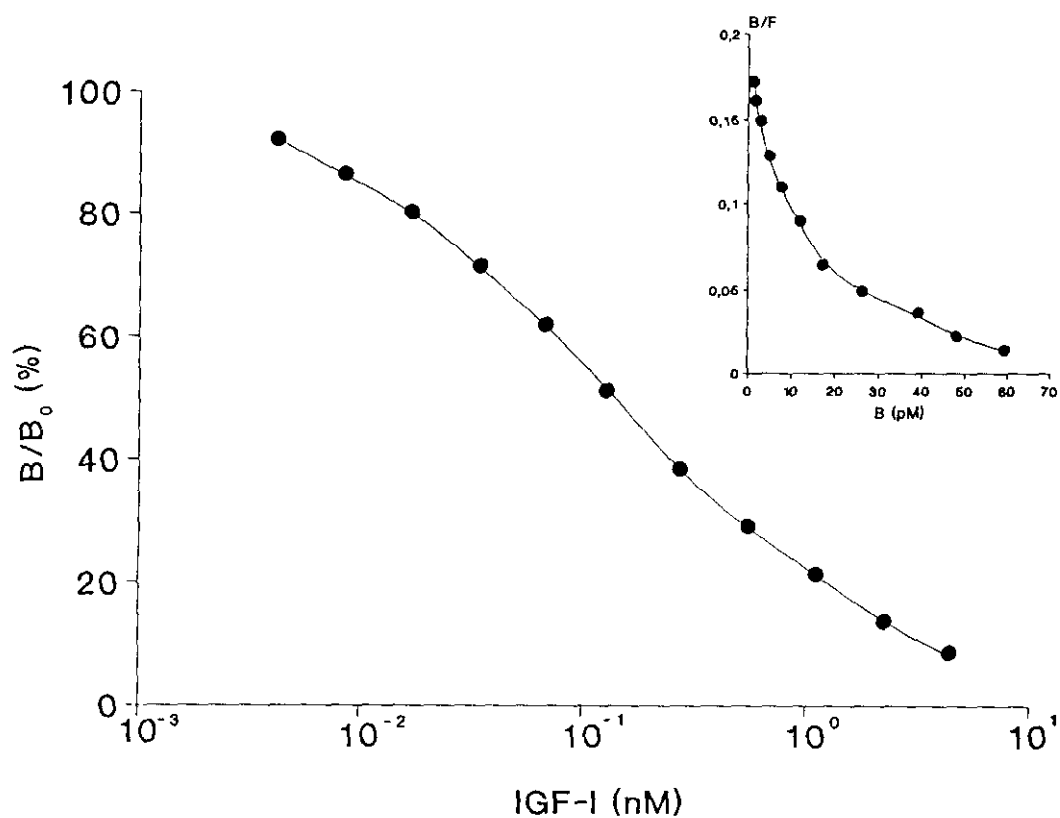
El análisis se lleva a cabo en dos días. El primer día se dedica a la preparación de las muestras (con extracción de las mismas si ha lugar), a la preparación de la curva patrón y a la incubación de los reactivos. El segundo día se dedica a la separación de la radiactividad libre y al conteo de los tubos. Salvo que se especifique lo contrario, todas las operaciones tienen lugar a temperatura ambiente.

Además de los tubos correspondientes a la curva patrón y a las muestras se preparan los tubos correspondientes a la radiactividad total (T), al ligamiento máximo ( $B_0$ ) y al ligamiento inespecífico (N).

La curva patrón abarca un rango de concentraciones de 33,33 a 0,03 ng/ml y se analiza por duplicado. Tanto las muestras sometidas a extracción en ácido fórmico-acetona como las sometidas a filtración en gel se valoran por duplicado a las diluciones convenientes. A los tubos con las muestras y a los patrones se les añade sucesivamente la dilución del antisuero y del radioligando, se agitan y se dejan incubar a 4 °C durante toda la noche. Al día siguiente se añade la suspensión del segundo anticuerpo, se deja incubar durante 30 minutos a temperatura ambiente y finalmente se añade agua destilada. Se



**Figura 2.4.** *Curva de titulación del antisuero anti IGF-I.*



**Figura 2.5.** Curva de desplazamiento de IGF-I obtenida en las condiciones del RIA de IGF-I empleando el antisuero policlonal de KabiGen a la dilución final de 1:3000. Cada punto representa la media de tres determinaciones. Arriba a la derecha, representación de Scatchard de la curva de desplazamiento.

centrifugan los tubos a  $1500\times g$  a  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 10 minutos, se descarta el sobrenadante y se cuenta el precipitado durante 2 minutos en el contador de radiactividad gamma.

#### **2.4.2.5. RIA de muestras sometidas a extracción en ácido-etanol.**

El procedimiento es en todo análogo al que se sigue para las muestras filtradas y extraídas en ácido fórmico-acetona, con la salvedad de que la curva patrón se prepara en mezcla P/AE/Tris. Las muestras se analizan por duplicado a las diluciones convenientes, que también se efectúan en mezcla P/AE/Tris.

#### **2.4.2.6. Especificidad del RIA de IGF-I.**

Como toda reacción inmunológica, las que tienen lugar en el RIA muestran un alto grado de especificidad. No obstante, con frecuencia pueden observarse reacciones cruzadas con antígenos muy relacionados. Una condición necesaria para que un RIA sea válido es que el contenido hormonal aparente de una muestra desconocida no dependa de la dilución a la cual se analiza. Para ello la muestra problema se debe analizar a varias diluciones y comprobar que la curva de dilución de la muestra problema es superponible a la curva de dilución de la hormona patrón.

##### **2.4.2.6.1. Uso de un patrón heterólogo.**

Debido a la gran similitud de las estructuras primarias de hIGF-I y rIGF-I ambas hormonas pueden ser indistinguibles desde el punto de vista inmunoquímico. No obstante, como los antisueros a menudo pueden distinguir entre hormonas que difieren en un solo aminoácido, es esencial, antes de emplear hIGF-I como patrón para rIGF-I, comprobar la reactividad de ambas hormonas.

Para ello se analizaron, en las condiciones habituales del RIA, diluciones seriadas en tampón de RIA de rhIGF-I y de una muestra de suero patrón de rata sometida a filtración en gel. En la misma prueba se analizaron diluciones seriadas de una muestra de suero humano sometido también a filtración en gel. En la figura 2.6.A se aprecia el paralelismo de la curva de desplazamiento del suero de rata con respecto a la curva de rhIGF-I, lo que valida el empleo de este péptido como patrón en la determinación radioinmunológica de la concentración de rIGF-I. Como era de esperar, la curva de desplazamiento de suero humano es paralela a la de rhIGF-I.

##### **2.4.2.6.2. Reacción cruzada con péptidos análogos.**

Debido a la gran similitud en las estructuras primarias de los péptidos insulínicos entre sí (IGF-I, IGF-II e insulina) es necesario descartar la interferencia de IGF-II o insulina en

el RIA de IGF-I o, en caso de que la hubiera, determinar en qué medida es aceptable el error derivado de ella.

Para estudiar el grado de reacción cruzada de IGF-II e insulina en el RIA de IGF-I se analizaron, en las condiciones habituales del RIA, diluciones seriadas de ambos péptidos junto con rhIGF-I en tampón de RIA. La figura 2.6.B muestra las curvas de desplazamiento de IGF-I así obtenidas. Mientras que con insulina porcina no hay desplazamiento aun a concentraciones  $10^5$  veces superiores a la  $ED_{50}$  de la curva de IGF-I, con IGF-II se obtiene una curva de desplazamiento paralela a esta última. El porcentaje de interferencia de IGF-II en el RIA de IGF-I, calculado como la relación entre las  $ED_{50}$  de ambas curvas, es del 11,7%. A la vista de este resultado, los valores de IGF-I obtenidos se corrigieron en función de la concentración de IGF-II presente en cada muestra.

#### **2.4.2.7. Variación intra e interensayo.**

El coeficiente de variación intraensayo para las muestras analizadas mediante RIA tras distintos procedimientos de separación de IGFBPs fue de 8,01 % para las muestras filtradas en gel, 7,15 % para las muestras extraídas en ácido fórmico-acetona y 7,94 % para las muestras extraídas en ácido-etanol.

El coeficiente de variación interensayo del RIA de IGF-I fue de 12,35 %.

#### **2.4.3. RIA de insulina.**

##### **2.4.3.1. Material y reactivos.**

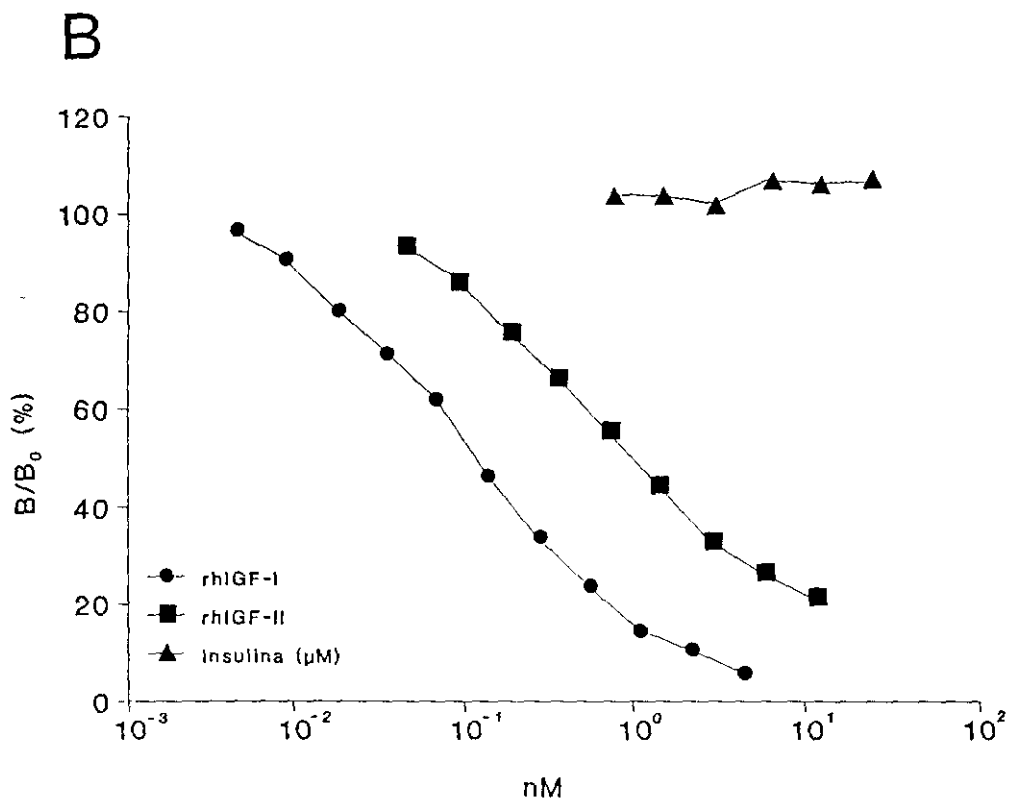
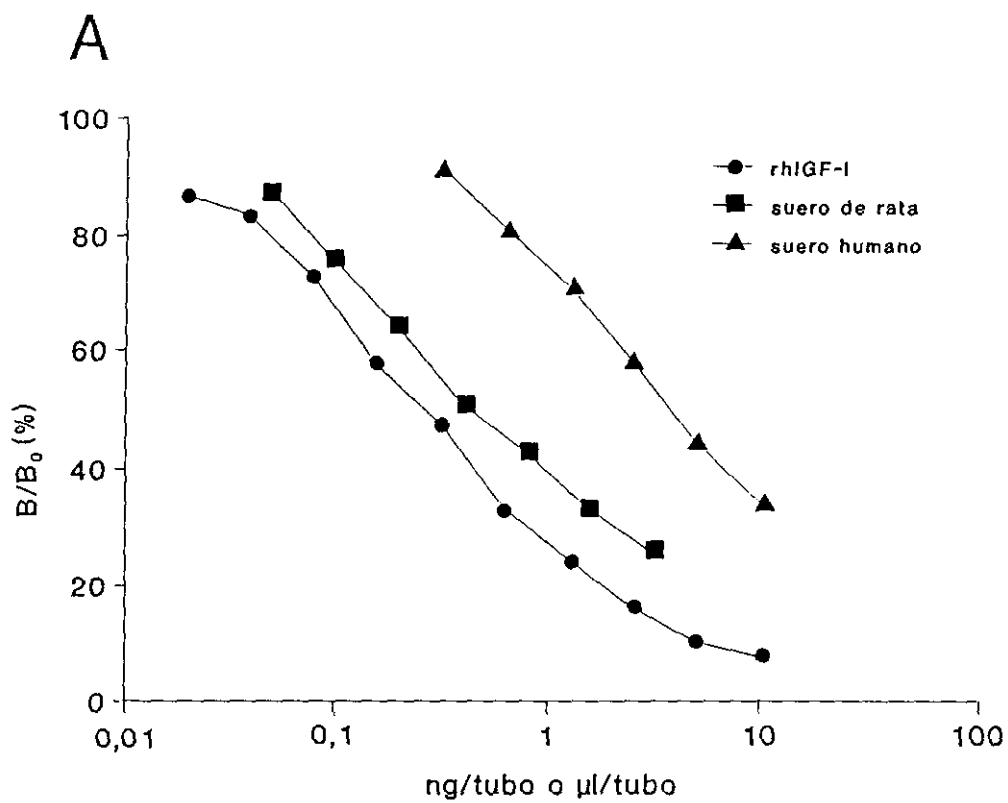
Para la determinación de la concentración de insulina en suero de rata empleamos un "kit" específico de Novo Nordisk A/S (Bagsvaerd, Dinamarca). Este "kit" consta de los siguientes productos, que se suministran liofilizados:

*Insulina de rata*, que se utiliza como patrón. Es necesario utilizar esta insulina como patrón en lugar de la insulina humana, ya que en caso contrario la sensibilidad es menor.

*Insulina humana radioyodada* en el residuo de tirosina A19, con una actividad específica de 30 mCi/mg.

*Antisuero antiinsulina porcina* obtenido de cobaya.

Se requieren además los siguientes reactivos:



**Figura 2.6.** Curvas de desplazamiento en el RIA de IGF-I. En A las curvas se obtuvieron con rhIGF-I y sueros de rata y humano filtrados. En B las curvas se obtuvieron con rhIGF-I, rhIGF-II e insulina porcina para evaluar el grado de reacción cruzada de los dos últimos péptidos. Cada punto representa la media de tres determinaciones.

*FAM.* Es un tampón fosfato 0,04 M pH 7,4 suplementado con BSA (Sigma "RIA grade") al 0,1% (p/v) y mertiolato sódico. Se emplea para diluir el antisuero y el radioligando.

*FAM sódico.* Es el tampón anterior al que se añade NaCl para hacerlo isotónico y BSA al 6% (p/v) para imitar la concentración proteica del suero. Se emplea para la preparación de la curva patrón y para diluir las muestras de suero en caso necesario.

*Mezcla etanol-FAM.* Consta de un 96% (v/v) de etanol al 96% y un 1,8% (v/v) de FAM en agua destilada. Se emplea para lavar el precipitado.

#### **2.4.3.2. Procedimiento del análisis.**

El análisis se lleva a cabo en dos días. El primer día se dedica a la preparación de las muestras, a la preparación de la curva patrón y a la incubación con exceso de antisuero. El segundo día se añade el radioligando y tras un breve periodo de incubación se separa la radiactividad libre y se cuentan los tubos. El análisis se efectúa en frío hasta el momento de la separación de la radiactividad libre.

Además de los tubos correspondientes a la curva patrón y a las muestras se preparan los tubos correspondientes a la radiactividad total (T), al ligamiento máximo ( $B_0$ ) y al ligamiento inespecífico (N).

La curva patrón abarca un rango de concentraciones de 1,33 a 0,04 ng/ml y se analiza por duplicado, al igual que las muestras. A los tubos con las muestras y a los patrones se les añade la dilución del antisuero, se agitan y se dejan incubar a 4 °C durante 20 a 24 horas. Al día siguiente se añade la dilución de radioligando y se deja incubar durante 4 horas a 4 °C. Transcurrida esta incubación se añade etanol al 96% para provocar la precipitación del complejo inmunológico, se agitan los tubos y se centrifugan a  $2000 \times g$  durante 10 minutos. Se descarta el sobrenadante y se lava el precipitado en mezcla etanol-FAM; tras una nueva centrifugación se elimina el sobrenadante, se redisuelve el precipitado en NaOH 0,05N y se cuenta durante 2 minutos en el contador de radiactividad gamma.

#### **2.4.4. Cálculos.**

Para calcular la concentración de IGF-I en las muestras se empleó un programa del contador de radiactividad gamma. La curva patrón se construye según una representación logit. En este tipo de representación se señala en ordenadas el logaritmo natural de la concentración de hormona, y en abscisas la función logit de la proporción de ligamiento  $B/B_0$ .

Esta proporción se calcula según la fórmula:

$$B/B_0 = \frac{B - N}{B_0 - N}$$

donde:

B = número de cpm del tubo (patrón o muestra) correspondiente;

B<sub>0</sub> = media del número de cpm de los tubos B<sub>0</sub> (ligamiento máximo);

N = media del número de cpm de los tubos N (ligamiento inespecífico).

La función logit se calcula según la siguiente fórmula:

$$\text{logit } B/B_0 = \ln \frac{B/B_0}{1 - (B/B_0)}$$

El programa calcula para cada muestra logit B/B<sub>0</sub>, interpola en la curva patrón la concentración correspondiente y calcula la media de los duplicados. Finalmente el resultado se multiplica por el factor de dilución que convenga en cada caso.

## **2.5. Determinación de la concentración sérica de IGF-II mediante RRA**

### **2.5.1. Principio.**

El RRA es, al igual que el RIA, un caso particular del radioanálisis competitivo. En este caso la competición se establece entre una hormona (IGF-II) marcada y la misma hormona no marcada por la unión a un receptor específico.

Los receptores se obtuvieron a partir de hígado de rata adulta. Se sabe que en la rata adulta este tejido presenta receptores de IGF tipo II, y carece prácticamente de receptores tipo I (Ver 1.5.1.); por centrifugación diferencial se consiguió una preparación de membrana plasmática particulada enriquecida en receptores de IGF tipo II.



### **2.5.2. Preparación de membrana plasmática particulada de hígado de rata.**

Todo el proceso de preparación de membranas se llevó a cabo en hielo o en la cámara fría. Los hígados de rata, obtenidos según se detalla en 2.1.7.4., se homogeneizaron en una solución de sacarosa 0,25 M con PMSF 0,5 mM, en la proporción de 3,5 ml/g de tejido.

Una vez reunidos los homogenados se filtró todo ello a través de una gasa, y a continuación se centrifugó a  $600\times g$  durante 10 minutos a 4 °C. Los sobrenadantes se sometieron a una centrifugación a  $17.000\times g$  durante 30 minutos a 4 °C; los sobrenadantes que resultaron de esta centrifugación se reunieron en una probeta, y se añadió NaCl y  $MgSO_4\cdot 7H_2O$  a la concentración final de 0,1 M y 1,0 M respectivamente. Una vez disueltas las sales se efectuaron dos centrifugaciones a  $40.000\times g$  durante 40 minutos a 4 °C; el precipitado resultante se resuspendió en tampón Tris-HCl 50 mM pH 7,7 y se homogeneizó manualmente. A continuación se separó una alícuota, en la cual se efectuó la determinación de la concentración de proteínas según el método de Lowry (Ver 2.6.2.).

Esta preparación se conservó a -80 °C repartida en alícuotas.

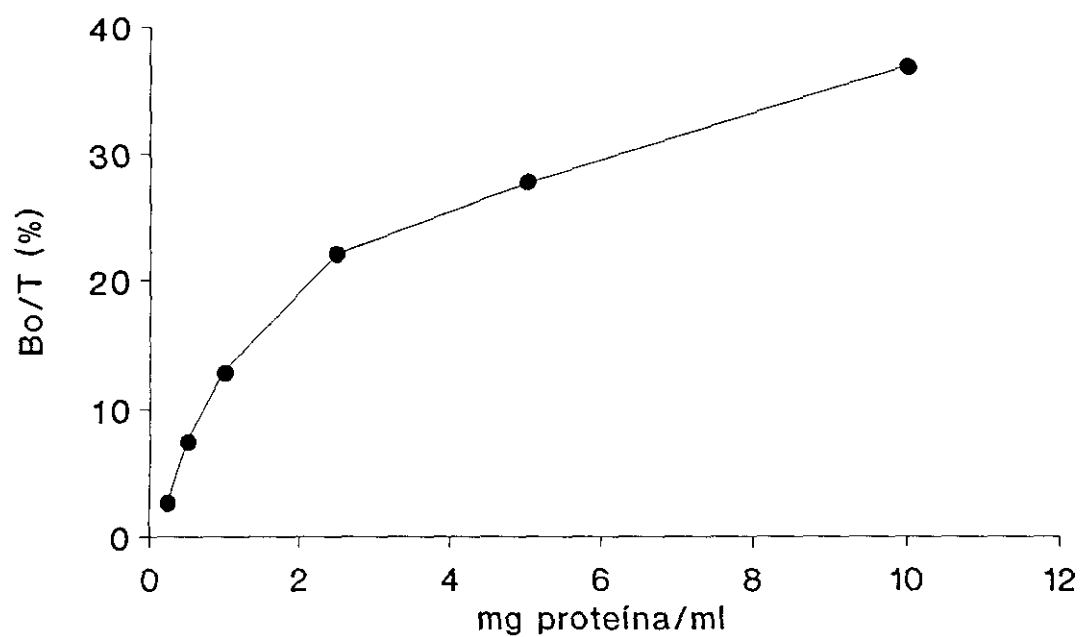
### **2.5.3. Evaluación de la preparación de membranas.**

El objeto de esta prueba fue determinar la concentración de proteínas en la preparación de membranas que proporciona una adecuada sensibilidad en el análisis.

La preparación de membranas se analizó en un rango de concentraciones entre 10 y 0,25 mg de proteína/ml en las mismas condiciones del RRA. Estas concentraciones se prepararon por diluciones en tampón Tris-HCl a partir de la preparación madre. Como muestra la figura 2.7., el ligamiento específico de IGF-II parece tender a un máximo, entre 30 y 40%, a partir de 10 mg de proteína/ml. Para las determinaciones de IGF-II hemos escogido una concentración de proteínas de 1 mg/ml, que proporciona un 13,1% de unión específica.

### **2.5.4. Material y reactivos.**

*Patrón.* La hormona que empleamos como patrón es rhIGF-II (IGF-II humano recombinante) de Boehringer Mannheim, que se presenta en forma de liofilizado. Se obtiene de *E. coli* y presenta una pureza >95%. Esta misma hormona se emplea en los marcapos.



**Figura 2.7.** Efecto de la concentración de proteínas sobre el ligamiento de IGF-II en la preparación de membranas de hígado de rata adulta. Cada punto representa la media de tres determinaciones.

*Tampón de RIA.* Este tampón se empleó para diluir el patrón y para reconstituir los liofilizados de las muestras de suero sometidas a filtración en gel. Es el mismo tampón que se utilizó en el RIA de IGF-I.

*Tampón Tris-HCl.* Se trata de una solución de Tris base 0,05 M con BSA al 0,5% (p/v); una vez disuelta la albúmina se ajusta el pH a 7,7. Este tampón se empleó para diluir la preparación de membrana y el radioligando, así como para el lavado de los tubos tras la primera centrifugación.

*Radioligando.* Se utilizó  $^{125}\text{I}$ -IGF-II marcado según se detalla en 2.3. Se diluye en tampón Tris-HCl para dar unas 10.000 cpm/tubo.

*Membrana.* La preparación de membrana se empleó diluida en tampón Tris-HCl a la concentración de 1 mg proteína/ml, según se determinó previamente (2.5.3.).

#### **2.5.5. Preparación de las muestras.**

Las muestras de suero se analizaron una vez sometidas a filtración en gel, según se detalla en 2.2.1.4., con la finalidad de separar las proteínas ligadoras de IGF.

#### **2.5.6. Procedimiento del análisis.**

El análisis se lleva a cabo en dos días. El primer día se dedica a la preparación de las muestras, a la preparación de la curva patrón y a la incubación de los reactivos. El segundo día se dedica a la separación de la radiactividad libre y al conteo de los tubos. Todo el análisis se efectúa en frío.

Se emplean tubos de microcentrífuga de 300  $\mu\text{l}$ . Además de los tubos correspondientes a la curva patrón y a las muestras se rotulan los tubos correspondientes a la radiactividad total (T), al ligamiento máximo ( $B_0$ ) y al ligamiento inespecífico o máximo desplazamiento (N); este último se determina en presencia de un exceso de IGF-II frío.

La curva patrón abarca un rango de concentraciones de 66,67 a 0,07 ng/ml y se analiza por triplicado, al igual que las muestras. A los tubos con las muestras y a los patrones se les añade sucesivamente la dilución del radioligando y de la preparación de membranas, se agitan y se dejan incubar a 4 °C durante 20 horas. Al día siguiente se centrifugan durante 10 minutos a 12.000 rpm (Microfuge 11, Beckman) y se aspira el sobrenadante. El precipitado se lava con tampón Tris-HCl frío, se centrifugan los tubos a 12.000 rpm durante 3 minutos y se aspira nuevamente el sobrenadante. Se cuenta el precipitado en el contador de radiactividad gamma.

### **2.5.7. Especificidad del RRA de IGF-II.**

Análogamente a lo que sucede en el RIA, también la interacción entre un ligando y su receptor de membrana es altamente específica. Igualmente, es posible observar reacciones cruzadas con ligandos que presentan una estructura muy similar, por lo que las observaciones hechas en 2.4.2.6. son igualmente válidas aquí.

#### **2.5.7.1. Uso de un patrón heterólogo.**

Se analizaron, en las condiciones habituales del RRA, diluciones seriadas en tampón de RIA de rhIGF-II y de una muestra de suero patrón de rata sometida a filtración en gel. En la figura 2.8.A se aprecia el paralelismo de la curva de desplazamiento del suero de rata con respecto a la curva de rhIGF-II, lo que valida el empleo de este péptido como patrón en la determinación de la concentración de rIGF-II mediante radioanálisis de receptores.

#### **2.5.7.2. Reacción cruzada con péptidos análogos.**

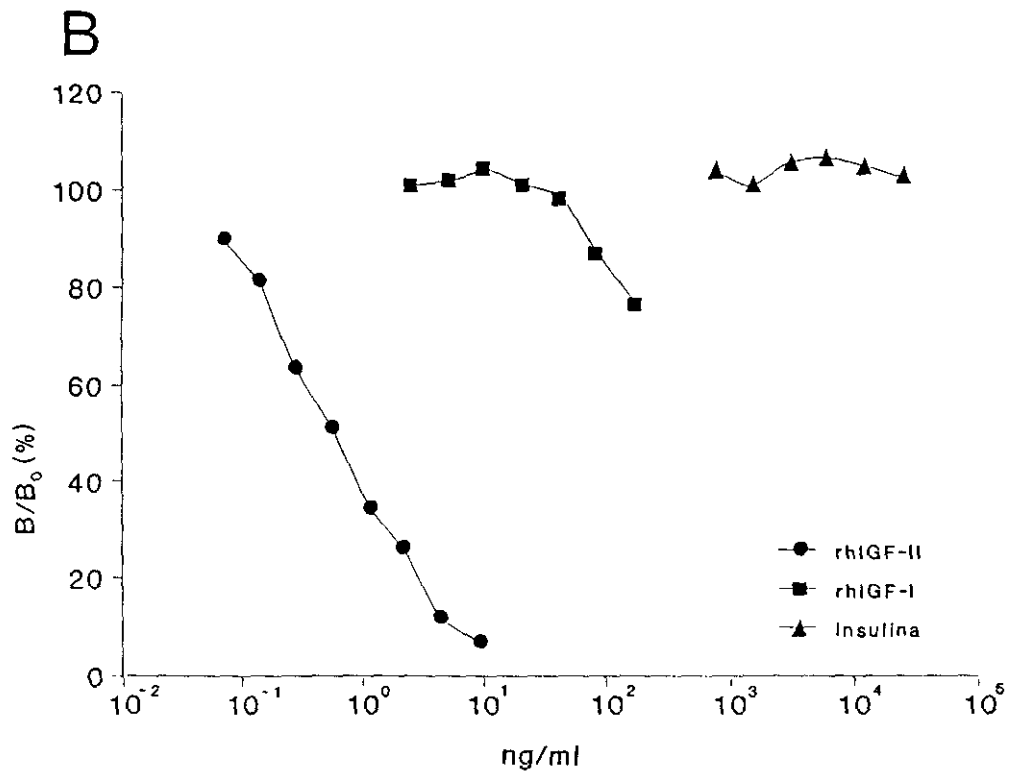
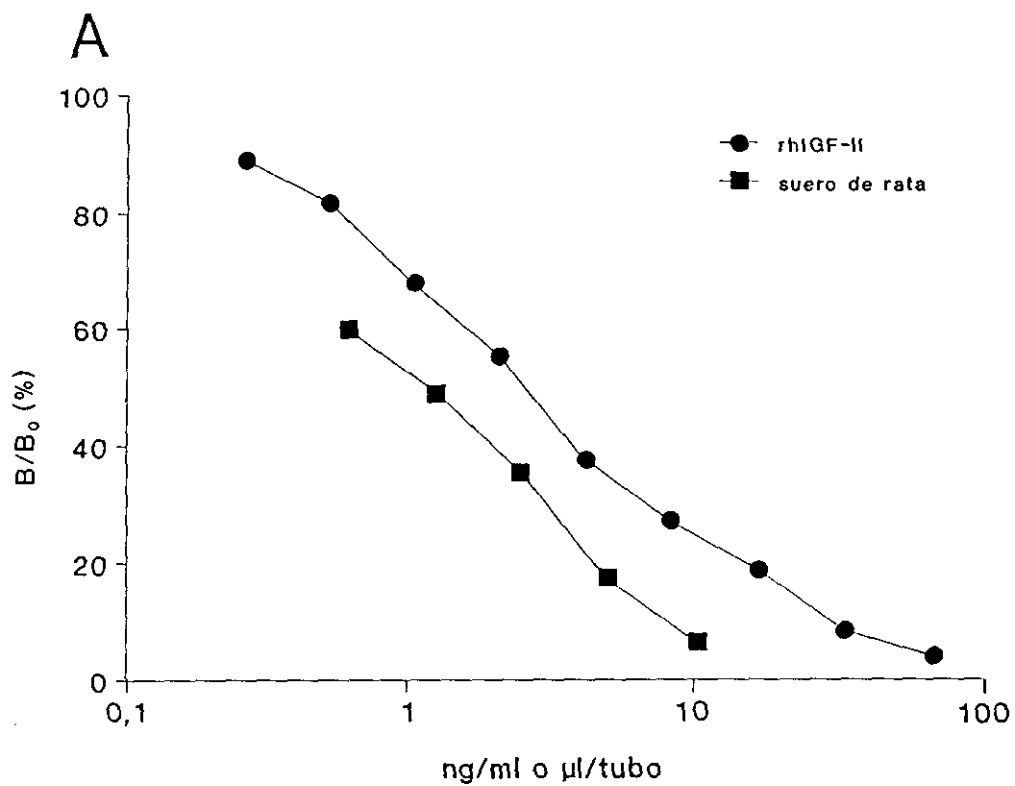
Para estudiar el grado de reacción cruzada de IGF-I e insulina en el RRA de IGF-II se analizaron, en las condiciones habituales del RRA, diluciones seriadas de ambos péptidos junto con rhIGF-II en tampón de RIA. La figura 2.8.B muestra las curvas de desplazamiento de IGF-II así obtenidas. Con insulina porcina no hay desplazamiento incluso a concentraciones  $10^5$  veces superiores a la  $ED_{50}$  de la curva de IGF-II. Aunque con IGF-I no hemos obtenido una curva de desplazamiento completa debido a la gran cantidad de péptido que habría sido necesario para ello, el resultado que muestra la figura permite extraer algunas conclusiones. Si suponemos que IGF-I desplaza el radioligando de manera paralela a IGF-II la interferencia de IGF-I en el RRA de IGF-II, calculada como la relación entre las  $ED_{50}$  de ambas curvas puede estimarse como aproximadamente un 1‰, muy inferior, por tanto, a la de IGF-II en el RIA de IGF-I.

### **2.5.8. Variación intra e interensayo.**

El coeficiente de variación intraensayo para las muestras analizadas mediante RRA fue de 8,35%. El coeficiente de variación interensayo fue del 9,93%.

### **2.5.9. Cálculos.**

El procedimiento seguido para calcular la concentración de IGF-II en las muestras es en todo análogo al del RIA (Ver 2.4.4.).



**Figura 2.8.** Curvas de desplazamiento en el RRA de IGF-II. En A las curvas se obtuvieron con rhIGF-II y suero de rata filtrado. En B las curvas se obtuvieron con rhIGF-II, rhIGF-I e insulina porcina para evaluar el grado de reacción cruzada de los dos últimos péptidos. Cada punto representa la media de tres determinaciones.

## **2.6. Otras determinaciones analíticas**

### **2.6.1. Análisis de la glucemia.**

#### **2.6.1.1. Glucosa en sangre total.**

La medición se efectuó en un analizador Reflolux® II M (Boehringer Mannheim); se trata de un aparato portátil de los que utilizan los individuos diabéticos para el autocontrol de su glucemia. Es un fotómetro de reflexión cuyo funcionamiento se basa en la coloración de una tira de plástico que posee en uno de sus extremos una zona impregnada de reactivo. La zona está dividida en dos mitades que se colorean con distinta intensidad y son leídas por un sistema óptico de doble haz, lo que permite un amplio intervalo de medición (entre 10 y 500 mg/100 ml). El tiempo total empleado en la determinación es de 2 minutos.

#### **2.6.1.2. Glucosa en sangre desproteinizada.**

La desproteinización se efectuó con una mezcla a partes iguales de  $\text{ZnSO}_4$  0,08M y  $\text{Ba(OH)}_2$  0,08M (mezcla de Somogyi); las proporciones fueron: 25  $\mu\text{l}$  de sangre, 125  $\mu\text{l}$  de  $\text{SO}_4\text{Zn}$  y 125  $\mu\text{l}$  de  $\text{Ba(OH)}_2$ . La mezcla se centrifugó durante 5 minutos y la glucosa se analizó en 50  $\mu\text{l}$  del sobrenadante por el método de la glucosa-oxidasa, enzima que cataliza la oxidación de esta hexosa a gluconato; dicha reacción se acopla a la oxidación de un cromógeno, catalizada por la peroxidasa. El compuesto coloreado producido presenta un máximo de absorbancia a 420 nm; la absorbancia es directamente proporcional a la concentración de glucosa y se compara con la que se obtiene con una solución patrón de ésta. Los reactivos se adquirieron de Boehringer Mannheim, que los suministra prácticamente dispuestos para su utilización.

#### **2.6.1.3. Determinación de la glucemia fetal en estado postabsortivo.**

Para la determinación de la glucemia fetal en estado postabsortivo se anestesió a la rata gestante con pentobarbital 5 horas después de habersele retirado el alimento (ratas diabéticas y controles) o de haber ingerido la ración (ratas subnutridas). La dosis de pentobarbital fue de 4 mg/100 g peso, que se administró, diluida en solución salina, por vía intraperitoneal. A los 30 minutos de anestesiada la rata se expusieron los fetos como se detalla en 2.1.5.1. y se les extrajo sangre para la determinación de la glucemia.

### **2.6.2. Determinación de la concentración de proteínas por el método de Lowry.**

El método que empleamos nosotros es una modificación del originalmente descrito por Lowry y cols. en 1951 (281). Este método se basa en la formación de un producto coloreado como consecuencia de dos reacciones: la reacción del biuret (formación de un

complejo coloreado con las sales de cobre de intensidad proporcional al número de enlaces peptídicos) y la reacción de reducción de los iones fosfomolibdato y fosfotungstato (presentes en el reactivo de Folin-Ciocalteu) por los restos de tirosina y triptófano.

Tanto las muestras como la curva patrón (preparada con varias concentraciones de BSA) se hacen reaccionar durante 10 minutos a temperatura ambiente con una solución constituida por  $\text{CuSO}_4$  al 0,1‰, tartrato sódico al 0,2‰,  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  al 2% y SDS al 1% (todos ellos p/v) en NaOH 0,1 N. A continuación se añade reactivo de Folin-Ciocalteu 1 N y se ponen los tubos al baño (37 °C) durante 30 minutos. Finalmente se lee la absorbancia a 500 nm y se calcula la concentración de proteínas en las muestras por interpolación en la curva patrón.

## **2.7. Análisis de las proteínas ligadoras de IGF mediante "Western blot"**

### **2.7.1. Fundamento.**

El análisis de proteínas ligadoras de IGF mediante "Western blot" reúne los conocimientos de varias técnicas. Mediante la electroforesis en gel de poliacrilamida (282) se consigue la separación de los IGFs y las distintas especies de IGFBPs. Esta separación es importante realizarla en condiciones no reductoras para no desnaturalizar las IGFBPs, ya que en caso contrario no habría unión al radioligando en el procedimiento de "ligand blot". A continuación las proteínas separadas en el gel se transfieren a una membrana de nitrocelulosa. En el procedimiento de "immunoblot" la membrana se incuba con anticuerpos específicos contra determinadas especies de IGFBPs, las cuales se visualizan a continuación mediante una reacción inmunoquímica. En el procedimiento de "ligand blot" (276) la membrana se incuba con  $^{125}\text{I}$ -IGF-I o II; este radioligando se une de manera específica a las proteínas ligadoras presentes en la membrana; para visualizar el tipo y cuantía de las mismas se efectúa la autorradiografía de la membrana.

### **2.7.2. Electroforesis.**

Para la electroforesis se empleó el sistema Protean® II xi de BioRad (Richmond, California). Con este equipo elaboramos geles separadores de 13 cm x 16 cm x 1,5 mm, con geles acumuladores de 1 cm de altura y capacidad para 25 muestras.

#### **2.7.2.1. Preparación del gel.**

Para preparar el gel separador al 12% se mezclan agua destilada, Tris-HCl 1,5 M pH 8,8 y solución de acrilamida/bis (30% T; 2,67% C). Esta solución se desgasifica en trompa de vacío, bajo agitación, durante 15 minutos. Transcurrido este tiempo se añaden SDS al 10% (p/v), TEMED y APS al 10% (p/v) recién preparado, se agita unos segundos

y la solución se vierte inmediatamente entre las placas de vidrio. Generalmente el gel separador se prepara la tarde anterior al experimento.

Para la preparación del gel acumulador se procede de manera análoga a la del gel separador. Se mezclan agua destilada, Tris-HCl 0,5 M pH 6,8 y solución de acrilamida/bis y se desgasifica durante 15 minutos bajo agitación; a continuación se añaden SDS al 10% (p/v), TEMED y APS al 10% (p/v), se agita y se vierte esta solución sobre el gel separador.

#### **2.7.2.2. Preparación y aplicación de las muestras.**

Las muestras se prepararon momentos antes de su aplicación. Cada muestra se diluyó en un tampón constituido por Tris-HCl 62,5 mM pH 6,8, glicerol al 10% (v/v) y SDS al 2% (p/v) en agua destilada. Como indicador contiene azul de bromofenol al 0,0125% (p/v). Este tampón no lleva en su composición ningún agente reductor.

Como marcador de pesos moleculares empleamos el patrón de amplio rango (6,5-200 kDa) de BioRad. El patrón se diluyó en el mismo tampón arriba señalado, pero con 2-mercaptoetanol al 10% (v/v).

A continuación muestras y patrón se calentaron a 95 °C durante 5 minutos, y se dejó que tomaran temperatura ambiente antes de su aplicación. Una vez listas las muestras y el patrón, se aplicaron a sus respectivos pocillos mediante microjeringas Hamilton.

#### **2.7.2.3. Protocolo de diluciones.**

El suero se diluyó generalmente 1:10 en tampón.

Los precipitados correspondientes a las muestras extraídas en ácido-etanol y en ácido fórmico-acetona se resuspendieron cuidadosamente en tampón para dar una dilución final 1:10, respecto al suero de partida.

Los extractos obtenidos tras filtración en gel, extracción en ácido-etanol y extracción en ácido fórmico-acetona se diluyeron en tampón para dar una dilución final 1:20 respecto al suero de partida.

Las cantidades aplicadas al gel se especifican en cada caso en la sección de Resultados.



#### **2.7.2.4. Condiciones de la electroforesis.**

El tampón electrodo empleado fue una solución de Tris 25 mM, glicina 192 mM y SDS al 0,1% (p/v), con un pH en torno a 8,3. La electroforesis se efectuó con corriente continua a razón de 35 mA por gel, y se prolongó hasta que el frente de tinción alcanzó el borde inferior del gel.

#### **2.7.3. Transferencia.**

##### **2.7.3.1. Material y reactivos.**

Para la transferencia electroforética empleamos el sistema Trans-Blot™ de BioRad, que consta de una cubeta con capacidad de transferencia para 3 geles, provista de electrodos de filamento de platino. La matriz empleada como soporte para la transferencia fue la membrana de nitrocelulosa de 0,2  $\mu$ m de tamaño de poro.

El proceso de transferencia tiene lugar en un tampón (tampón de Towbin) constituido por Tris 25 mM pH 8,3 aproximadamente, glicina 192 mM y metanol al 20% (v/v) en agua destilada.

##### **2.7.3.2. Procedimiento.**

Una vez concluida la electroforesis se extrajeron los geles y se sumergieron en tampón de transferencia, donde se dejaron equilibrar durante 15 a 20 minutos. A continuación se dispuso cada gel, en contacto con una lámina de nitrocelulosa, entre dos láminas de papel de filtro y dos almohadillas de Scotch Brite®, a manera de emparedado, el cual se colocó en un soporte para geles. Este soporte se cerró y se introdujo en la cubeta de transferencia, que se rellenó con tampón.

El proceso de transferencia se efectuó durante toda la noche en la cámara fría a 20 V (5 mA de corriente continua). Al día siguiente se extrajo la membrana de nitrocelulosa, se dejó secar y se introdujo en una bolsa de plástico. Las membranas procesaron inmediatamente o se conservaron a 4 °C en la bolsa de plástico hasta su procesamiento.

#### **2.7.4. Tinción con azul Coomassie. Estimación de los pesos moleculares.**

La parte del gel o de la membrana correspondiente al patrón se tiñó con azul Coomassie R-250 al 0,1% (p/v) en una solución de metanol al 40% (v/v) y ácido acético al 10% (v/v) en agua destilada. Se mantuvo en esta solución durante unos 10 minutos y a continuación se decoloró en otra solución constituida por metanol y ácido acético en agua destilada en las mismas proporciones.

Para la estimación de los pesos moleculares aparentes de las IGFbps analizadas mediante "Western blot" se representa el logaritmo del peso molecular de las proteínas patrón frente a su movilidad electroforética relativa ( $R_f$ ), la cual se define como la relación entre la distancia migrada por la proteína y la distancia migrada por el frente de tinción. El trazado gráfico es una recta, en la cual pueden interpolarse las  $R_f$  de las proteínas problema, obteniéndose su peso molecular aproximado.

#### **2.7.5. "Western ligand blot".**

##### **2.7.5.1. Reactivos.**

El tratamiento posterior de la membrana se efectuó en un tampón ("ligand blot buffer", LBB) constituido por Tris-HCl 0,01 M pH 7,55, NaCl 0,15 M y azida de sodio al 0,1% (p/v), en agua destilada. Este tampón es la base para las siguientes soluciones (todas ellas se conservaron en nevera hasta su uso):

##### **A. Soluciones para la preparación de la membrana.**

- a. Solución de Nonidet-P40 al 3% (v/v) en LBB.
- b. Solución de BSA al 1% (p/v) en LBB.
- c. Solución de Tween-20 al 0,1% (v/v) en LBB.

##### **B. Solución para la incubación de la membrana.**

Se preparó una solución de BSA al 1% (p/v) y Tween-20 al 0,1% (v/v) en LBB. En esta solución se diluyó el radioligando ( $^{125}\text{I}$ -IGF-I o II) a la concentración deseada para cada experimento.

##### **C. Soluciones para el lavado de la membrana.**

Además de LBB se necesita una solución de Tween-20 al 0,1% (v/v) en LBB.

##### **2.7.5.2. Preparación de la membrana.**

Antes de incubar la membrana con el radioligando es necesario bloquear los sitios de unión libres de la misma, lo cual se consigue exponiéndola a una alta concentración de BSA.

En primer lugar se lavó la membrana con la solución de Nonidet-P40 durante 30 minutos. Este lavado y los sucesivos se llevaron a cabo en la cámara fría, con agitación

suave. Transcurridos los 30 minutos la solución de Nonidet-P40 fue sustituida por la solución de BSA, que se mantuvo durante 2 horas. Finalmente la solución de BSA fue reemplazada por la de Tween-20; tras 10 minutos de lavado se eliminó esta solución.

#### **2.7.5.3. Incubación con el radioligando.**

Una vez finalizado el último lavado la membrana se dejó incubar a 4 °C en posición horizontal durante unas 18 a 20 horas con una alícuota de una solución de radioligando preparada momentos antes. La cantidad de radioligando empleada se detalla en Resultados con cada experimento concreto.

#### **2.7.5.4. Lavado, exposición y revelado.**

Una vez transcurrido el tiempo de incubación con el radioligando las membranas se sometieron a dos lavados sucesivos en tampón LBB con Tween-20 al 0,1% y tres en tampón LBB, bajo agitación por balanceo. Cada lavado duró 15 minutos y se efectuó en la cámara fría.

Concluidos los lavados se extendieron las membranas sobre papel de filtro y se dejaron secar. A continuación se montaron sobre una lámina de plástico transparente. Para la exposición se situó la membrana en contacto con la película, y todo ello entre dos pantallas intensificadoras (Kodak X-Omatic Regular), dentro de un cartucho de autorradiografía.

La exposición tuvo lugar a -80 °C. El tiempo de exposición varió en función de la cantidad de radiactividad que se esperaba tener en la membrana, entre 24 y 72 horas. Para el revelado empleamos un revelador automático Agfa Curix 60.

#### **2.7.5.5. Cuantificación densitométrica de las autorradiografías.**

La densidad óptica de las manchas presentes en las autorradiografías se cuantificó en un Densitómetro Personal de Molecular Dynamics (Sunnyvale, California). Se trata de un densitómetro láser de transmisión. El haz de láser de He-Ne de 50  $\mu\text{m}$  de diámetro se dirige a través de la muestra, la cual absorbe parte de la luz de manera proporcional a su densidad óptica. La luz que atraviesa la muestra es recogida por un cilindro colector integrador, pasa a un tubo fotomultiplicador y es convertida en corriente eléctrica. Esta señal analógica es a su vez convertida en señal digital y almacenada en el disco duro del ordenador integrado en el aparato. El resultado es una imagen de la muestra cuyos valores de pixel corresponden a la densidad óptica en la muestra. Un programa específico permite seleccionar sobre esta imagen diversas regiones y calcular su densidad óptica mediante integración por volumen (suma de los valores de todos los pixels de la región seleccionada).

menos la señal de fondo). En este trabajo los resultados de la integración por volumen se expresan como unidades de densidad óptica o como unidades arbitrarias relacionadas con la densidad óptica.

#### **2.7.6. "Western immunoblot".**

##### **2.7.6.1. Reactivos.**

El procesamiento de la membrana hasta el revelado se efectuó en un tampón TBS ("Tris-buffered saline") constituido por Tris-HCl 0,05 M pH 7,40 y NaCl 0,2 M en agua destilada. A partir de este tampón se prepararon las siguientes soluciones:

*TBS-Tween*: tampón TBS con Tween-20 al 0,75 % (v/v).

*Solución bloqueante*: TBS-Tween con leche en polvo desnatada al 5 % (p/v). Se prepara extemporáneamente.

*Solución de preincubación*: TBS con 0,05 mg/ml de BSA. En esta solución se diluye el anticuerpo primario antes de ponerlo en contacto con la membrana.

Los anticuerpos primarios se obtuvieron de UBI, Inc. (Nueva York, USA). Se trata de anticuerpos policlonales obtenidos en conejos inmunizados contra hIGFBP-1 (de líquido amniótico), hIGFBP-2 (de células de riñón), hIGFBP-3 (expresada en células CHO, de ovario de hámster chino) y hIGFBP-4 (de la línea de glioblastoma T98G). Se emplearon al título recomendado por el proveedor, que fue de 1:1000 para todos excepto para anti-hIGFBP-2, que fue de 1:2000.

El anticuerpo secundario está obtenido en cabras inmunizadas con anticuerpos de conejo. Se trata de una IgG (H + L) conjugada con fosfatasa alcalina, y se obtuvo de BioRad.

Para el revelado se requieren las siguientes soluciones: tampón Tris-MgCl<sub>2</sub> (constituido por Tris-HCl 0,1 M pH 9,5 y MgCl<sub>2</sub> 0,5 mM en agua destilada), solución de NBT 30 mg/ml en N,N-dimetilformamida al 70 % (v/v en agua destilada), y solución de BCIP, 15 mg/ml en N,N-dimetilformamida.

##### **2.7.6.2. Preparación de la membrana.**

Análogamente a lo que sucede en el "ligand blot", antes de incubar la membrana con el anticuerpo primario es necesario bloquear los sitios de unión libres de la misma, lo cual

se consigue exponiéndola a una alta concentración de proteína, presente en la leche en polvo.

En primer lugar la membrana se lavó con TBS-Tween durante 5 minutos; a continuación se reemplazó este tampón por solución bloqueante, que se mantuvo durante unos 30 minutos. El procesamiento de la membrana, tanto lavados como incubaciones, se llevó a cabo a temperatura ambiente y con agitación suave. Transcurridos los 30 minutos la membrana se lavó dos veces en TBS-Tween (5 minutos cada lavado).

#### **2.7.6.3. Incubación con el anticuerpo primario.**

Una vez lavada la membrana, se añadió TBS-Tween y una alícuota de solución de preincubación con el anticuerpo primario, de manera que el título final de éste era el deseado. El tiempo de incubación fue de aproximadamente 2 horas, transcurridas las cuales la membrana se lavó una vez en solución bloqueante y tres veces en TBS-Tween (5 minutos cada lavado).

#### **2.7.6.4. Incubación con el anticuerpo secundario.**

Tras la incubación con el anticuerpo primario y el lavado de la membrana se añadió TBS-Tween y una alícuota del anticuerpo secundario, de modo que su título final era el deseado. El tiempo de incubación con el anticuerpo secundario fue de 1 a 3 horas.

Una vez terminada la incubación con el segundo anticuerpo la membrana se lavó 3 veces en TBS-Tween y 2 veces en TBS (5 minutos cada lavado) y finalmente se escurrió en papel de filtro.

#### **2.7.6.5. Revelado de la membrana.**

El revelado se basa en una reacción química catalizada por la fosfatasa alcalina conjugada al anticuerpo secundario, en el curso de la cual se genera sobre la membrana un producto insoluble de color púrpura (283).

La solución de revelado se preparó añadiendo 1 ml de solución de NBT y 1 ml de solución de BCIP a 100 ml de tampón Tris-MgCl<sub>2</sub>. En esta solución se sumergió la membrana, agitando suavemente, durante el tiempo que se consideró conveniente según la señal y el fondo deseados.

Para detener la reacción se transfirió la membrana a un recipiente con agua destilada durante unos 10 minutos agitando suavemente. Finalmente la membrana se dejó secar en papel de filtro.

### **2.7.7. Evaluación de los anticuerpos anti-IGFBPs en el "Western immunoblot". Comparación con el "Western ligand blot".**

Antes de su aplicación en la identificación de las IGFBPs circulantes se comprobó el grado de reacción cruzada de los antisueros anti-IGFBPs disponibles con las IGFBPs de rata para establecer su posible utilidad en nuestros experimentos.

Para ello se efectuó la separación electroforética y posterior transferencia a nitrocelulosa de muestras de suero de rata de varias edades (feto de 21 días, neonato de 8 días y adulto) junto con una muestra de suero humano adulto. Se analizaron seis grupos de muestras, cada uno de los cuales contenía los sueros arriba señalados en calles adyacentes. Se obtuvieron así seis tiras de nitrocelulosa, cinco de ellas para incubar cada una con un antisuero anti-IGFBP diferente, más un suero de conejo no inmune como control. En la tira restante se efectuó el análisis de las IGFBPs mediante "ligand blot" empleando  $^{125}\text{I}$ -IGF-II.

La figura 2.9. muestra el resultado de esta prueba. Todos los antisueros, a excepción del antisuero anti-hIGFBP-4, originan alguna señal en suero humano. Con anti-hIGFBP-1 se obtienen dos bandas de similar intensidad a 36 y 43 kDa. Con anti-bIGFBP-2 el suero humano presenta una banda a 34 kDa; en la rata fetal y neonatal aparece una banda muy intensa a 29-30 kDa que en rata adulta es apenas perceptible. Aunque el método no es cuantitativo, sí se aprecia una clara disminución en la intensidad de esta banda entre la rata fetal y la rata neonatal. Por encima de esta banda, a 30 kDa, se aprecia con este mismo antisuero, también en suero de rata fetal y neonatal, otra banda muy tenue. El antisuero anti-hIGFBP-3 revela, en suero humano, por un lado dos bandas entre 43 y 50 kDa, y una banda ancha entre 28 y 31 kDa. La ausencia de reacción con antisuero anti-hIGFBP-4, tanto en humano como en rata, pero especialmente en humano, donde era de esperar que estuviera presente, quizá se deba a la escasa cantidad de esta proteína presente en el suero, en comparación con el resto de formas de IGFBP. Finalmente, no hubo ningún tipo de reacción inespecífica al incubar una de las tiras de nitrocelulosa con un suero de conejo no inmune.

El análisis comparativo mediante "Western ligand blot" mostró en feto y neonato un patrón caracterizado por una banda muy intensa de aproximadamente 29 kDa, que a la vista del resultado del "immunoblot" está constituida en gran medida por IGFBP-2. Esta banda no es visible en el suero de rata adulta, en el que se aprecian claramente dos bandas de entre 43 y 50 kDa; a penas son perceptibles una banda tenue de 28 kDa y otra de 24 kDa, esta última presente también en el suero fetal y neonatal. En el suero humano se observan dos bandas de entre 43 y 50 kDa, una banda más tenue de 34 kDa, correspondiente a IGFBP-2, y, apenas perceptibles, una banda a 28 kDa y otra a 24 kDa.

Por lo tanto, el único antisuero que mostró reacción de cruce en suero de rata fue el antisuero anti-bIGFBP-2, que empleamos para detectar esta IGFBP en nuestras muestras.

## **2.8. Estudio del ligamiento de IGF-I y II a membranas de hígado, cerebro y placenta de rata**

### **2.8.1. Principio.**

El estudio del ligamiento de hormonas a preparaciones de membranas se basa, al igual que el RIA y el RRA, en el radioanálisis competitivo. En este tipo de estudios, una vez obtenida la preparación de membranas, se determinan habitualmente el porcentaje de ligamiento específico y las propiedades cinéticas de los receptores.

### **2.8.2. Preparación de membranas.**

La preparación de membranas se efectuó según el método de Havrankova y cols. (284). Todo el proceso se llevó a cabo en hielo. Las muestras de hígado, cerebro y placenta, obtenidas según se detalla en 2.1.7., se homogeneizaron en un tampón bicarbonato con inhibidores de fosfatasas y proteasas ( $\text{NaHCO}_3$  1mM, NaF 100 mM,  $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$  10 mM,  $\text{Na}_3\text{VO}_4$  2 mM, pH 7,8 con PMSF 2 mM) en la proporción de 3,5 ml/g de tejido.

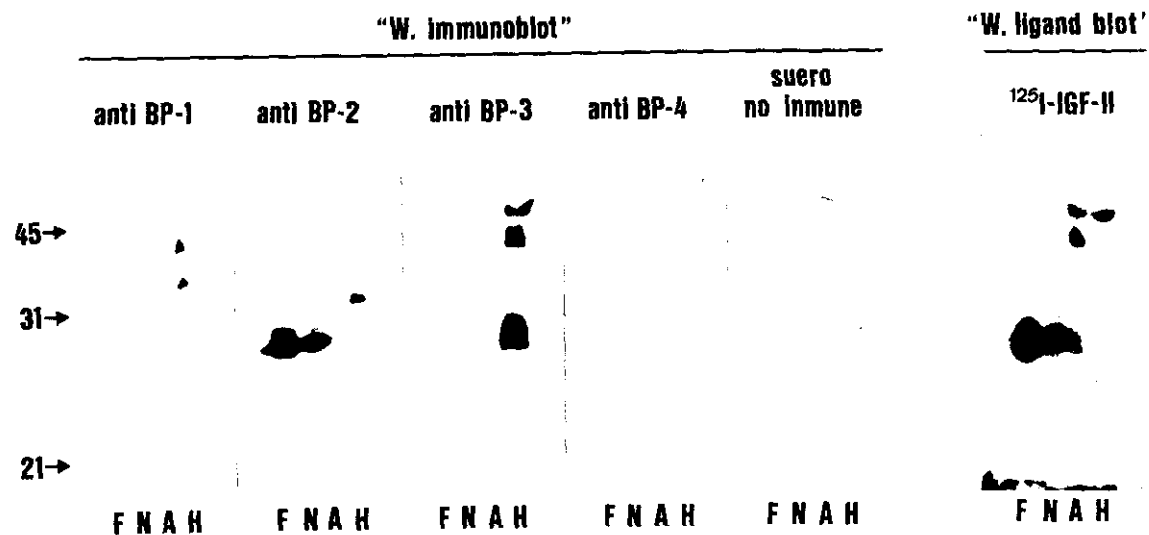
Los homogenados se centrifugaron a  $600\times g$  durante 15 minutos a 4 °C. Los sobrenadantes se trasvasaron a otros tubos y se sometieron a una centrifugación a  $20.000\times g$  durante 30 minutos a 4 °C; tras decantar el sobrenadante se resuspendió el precipitado en tampón bicarbonato y se centrifugó de nuevo en las mismas condiciones. El precipitado resultante se resuspendió en 1 ml de tampón KRP (ver más adelante) y se pasó varias veces por una aguja Yale® Microlance® 25/6 para disgregar la preparación.

Finalmente se repartió la preparación en alícuotas y se conservó a -80 °C. En una alícuota se efectuó la determinación de la concentración de proteínas según el método de Lowry (Ver 2.6.2.).

### **2.8.3. Cuantificación del ligamiento de IGF a membranas.**

#### **2.8.3.1. Material y reactivos.**

*Tampón KRP* (Krebs-Ringer-fosfato). Está constituido por NaCl 0,12 M, KCl 5 mM,  $\text{MgSO}_4$  1,2 mM,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1,2 mM y  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  10 mM, pH 7,3-7,5. Se empleó para diluir las preparaciones de membranas a las concentraciones adecuadas según el tejido y el ligando (Ver 2.8.5.3.).



**Figura 2.9.** Análisis mediante "Western immunoblot" y "Western ligand blot" de las IGFBPs de suero de rata fetal (21 días) (F), neonatal (8 días) (N) y adulta (A), y de suero humano adulto (H). Para el "immunoblot" se probaron los antisueros de conejo anti-hIGFBP-1, 3 y 4 y anti-bIGFBP-2 y un suero de conejo no inmune en tiras de nitrocelulosa independientes, cada una de las cuales contenía 5  $\mu\text{l}$  de cada muestra de suero. Para el "ligand blot" se incubó una de las tiras con  $10^6$  cpm de  $^{125}\text{I}$ -IGF-II; el tiempo de exposición fue de 6 días. A la izquierda, patrones de pesos moleculares (en kDa).



**Tampón KRP-BSA.** Se trata de tampón KRP con BSA al 3% (p/v) y 3 mg/ml de bacitracina, y se empleó para diluir el radioligando, así como la hormona fría que se utilizó como inespecífico o en las curvas de desplazamiento.

**Radioligando.** Se emplearon  $^{125}\text{I}$ -IGF-I y II marcados según se detalla en 2.3., diluidos en tampón KRP-BSA para dar unas 10.000 cpm/tubo.

#### **2.8.3.2. Procedimiento del análisis.**

Se emplean tubos de microcentrífuga de 300  $\mu\text{l}$ . Se rotulan los tubos correspondientes a la radiactividad total (T), al ligamiento máximo ( $B_0$ ) y al ligamiento inespecífico o máximo desplazamiento (N); este último se determina en presencia de un exceso de IGF-II frío (para el ligamiento de IGF-II) o de IGF-I o insulina (Novo Actrapid\*, insulina monocomponente de páncreas porcino) fríos (para el ligamiento de IGF-I). Para las curvas de desplazamiento se preparan diluciones de IGF frío en tampón KRP-BSA.

A los tubos (excepto los totales, que sólo llevan la dilución del radioligando) se les añade sucesivamente tampón KRP-BSA (para el ligamiento máximo), hormona fría en exceso (para el ligamiento inespecífico) o bien las distintas diluciones de IGF frío (para las curvas de desplazamiento), a continuación la dilución del radioligando y finalmente la preparación de membranas, se agitan y se dejan incubar a 4 °C durante 15 horas, o bien a temperatura ambiente durante 4 horas. Las condiciones de incubación se habían determinado previamente como se detalla más adelante (2.8.5.2.). Transcurrido el tiempo de incubación se centrifugan durante 5 minutos a 12.000 rpm (Microfuge 11, Beckman), se ponen en hielo y se aspira el sobrenadante. El precipitado se lava con solución de sacarosa 0,25 M fría, se centrifugan los tubos a 12.000 rpm durante 3 minutos y se aspira nuevamente el sobrenadante. Por último se cuenta el precipitado en el contador de radiactividad gamma.

Los resultados se expresan como tanto por ciento de ligamiento específico con respecto a la radiactividad total ( $\%B_0/T$ ) o como tanto por ciento de ligamiento específico con respecto al ligamiento específico máximo ( $\%B/B_0$ ). El ligamiento específico se obtiene restando al ligamiento total la parte correspondiente al ligamiento inespecífico.

#### **2.8.4. Determinación de la degradación del radioligando.**

Para comprobar la cuantía de la degradación del radioligando en presencia de la preparación de membranas se comparó la radiactividad precipitable por ácido tricloroacético (TCA) en ausencia y en presencia de membranas tras el periodo de incubación. Para ello se prepararon tubos que contenían radioligando, tampón KRP y tampón KRP-BSA. Transcurrido el periodo de incubación se reunió el sobrenadante de

varios tubos B<sub>0</sub>, se pipeteó en una serie de tubos 150  $\mu$ l de este sobrenadante y en otra serie de tubos 150  $\mu$ l del contenido de los tubos con radioligando y tampón, se añadieron 150  $\mu$ l de TCA al 10% (p/v) a cada tubo, se agitaron y se centrifugaron a 3000 rpm (Minifuge T, Heraeus) durante 10 minutos. Finalmente se aspiró el sobrenadante y se contó el precipitado en el contador de radiactividad gamma.

El resultado se expresa como tanto por ciento de radiactividad presente en el precipitado de los tubos con membranas con respecto a la radiactividad de los tubos sin membranas.

#### **2.8.5. Caracterización del ligamiento de IGF a preparaciones de membrana plasmática.**

Previamente a los estudios de ligamiento se realizaron algunas pruebas para establecer las condiciones experimentales más adecuadas. Para estas pruebas se utilizaron preparaciones de membrana plasmática de hígado y cerebro de un grupo de ratas normales recién nacidas, así como de placentas de ratas normales de 17 días de gestación.

##### **2.8.5.1. Evaluación de la calidad de la albúmina empleada.**

La BSA se emplea en los estudios de ligamiento para minimizar la adsorción de los péptidos a la superficie de los tubos, saturar eventuales sitios de unión inespecífica de las membranas y proteger los péptidos de una posible degradación.

Con esta prueba se pretendía averiguar si el empleo de BSAs de distinta calidad influye en el porcentaje de unión específica, ya que la presencia de impurezas en forma de péptidos insulínicos puede falsear los resultados. Para ello se elaboraron curvas de desplazamiento, tanto de IGF-I como de IGF-II, empleando, en ambos casos, dos tipos de BSA de la casa Sigma: "BSA fraction V" y "BSA RIA-grade". Para IGF-I se utilizó una preparación de membranas de cerebro, y para IGF-II se utilizó una preparación de membranas de hígado, ambas a la concentración de 0,1 mg proteína/ml.

Como muestra la figura 2.10., las curvas obtenidas empleando los dos tipos de BSA son superponibles, por lo que en lo sucesivo se utilizó la "BSA fraction V", más económica, en todas las pruebas.

##### **2.8.5.2. Temperatura y tiempo de incubación.**

Se estudió la cinética de ligamiento de IGF-I a membranas de hígado (1,5 mg proteína/ml) y cerebro (0,1 mg proteína/ml) a temperatura ambiente. En ambos casos (Fig.

2.11.A) el máximo de ligamiento específico se alcanza a las 4 horas de incubación, y se sitúa en torno al 1,5% para el hígado y 0,9% para el cerebro.

Para IGF-II se hizo un estudio análogo en membranas de hígado (0,2 mg proteína/ml) a dos temperaturas de incubación, 4 °C y 20 °C (temperatura ambiente). Como muestra la figura 2.11.B, a 4 °C se alcanzó un máximo en torno al 15% de unión específica ya a las 5 horas de incubación. A 20 °C se llegó a un máximo de unión específica a los 15 minutos de incubación, produciéndose a continuación un ligero descenso en el porcentaje de unión, que alcanzó el equilibrio en torno al 10% a las 2 horas de incubación.

La degradación del radioligando al final de estas pruebas se situó en todos los casos en torno al 8%.

A la vista de estos resultados hemos elegido para nuestros experimentos un tiempo de incubación de 15 horas a 4 °C o de 4 horas a 20 °C.

### **2.8.5.3. Concentración de proteínas.**

El ligamiento específico de IGF depende también de la concentración de proteínas de la preparación. A fin de elegir una concentración de proteínas adecuada para los experimentos de ligamiento hemos determinado el porcentaje de unión específica de ambos ligandos, IGF-I y II, a preparaciones de hígado, cerebro y placenta.

#### **2.8.5.3.1. IGF-I.**

Con la finalidad de determinar el ligamiento inespecífico empleamos en estas pruebas tanto IGF-I como insulina para comprobar si podía utilizarse esta última, asequible en grandes cantidades, en lugar de IGF-I.

La figura 2.12. muestra cómo el ligamiento específico de IGF-I aumenta progresivamente con la concentración de proteínas y alcanza un máximo en hígado (entre 5 y 6%) a 4 mg de proteína/ml y en cerebro (en torno a 6%) a 1 mg de proteína/ml. Para nuestros experimentos hemos elegido las concentraciones de 1 mg de proteína/ml para hígado y 0,1 mg de proteína/ml para cerebro. No hay diferencias en la unión específica empleando para el máximo desplazamiento IGF-I (90 nM) o insulina (25  $\mu$ M).

En placenta se obtuvo un máximo de ligamiento específico (aproximadamente 3,5%) con 1 mg proteína/ml. La concentración de proteína adecuada nos habría proporcionado una unión específica muy baja, inferior al 2%, por lo que hemos excluido de nuestro estudio el ligamiento de IGF-I a placenta.

#### 2.8.5.3.2. IGF-II.

Como se muestra en la figura 2.12., tanto en hígado como en placenta se obtuvo un máximo de unión específica, en torno al 20 %, con una concentración de proteínas de 1 mg/ml. En cerebro el máximo se alcanzó en torno al 7% con 0,25 mg/ml.

Las concentraciones de proteínas que hemos elegido para los experimentos son 0,2 mg/ml para hígado y 0,1 mg/ml para cerebro y placenta.

#### 2.8.6. Análisis de Scatchard.

El porcentaje de ligamiento específico de una hormona a su receptor es fácil de determinar. Sin embargo, al depender simultáneamente del número y afinidad de los receptores, se requiere un análisis más riguroso de los resultados, como es el análisis de Scatchard (285).

Partiendo de la ley de acción de masas se deriva la ecuación que describe la interacción entre una hormona y su receptor, a partir de la cual pueden calcularse el número y la afinidad de los receptores:

$$B/F = -K_a \cdot B + K_a n$$

donde:

B = concentración de hormona ligada al receptor;

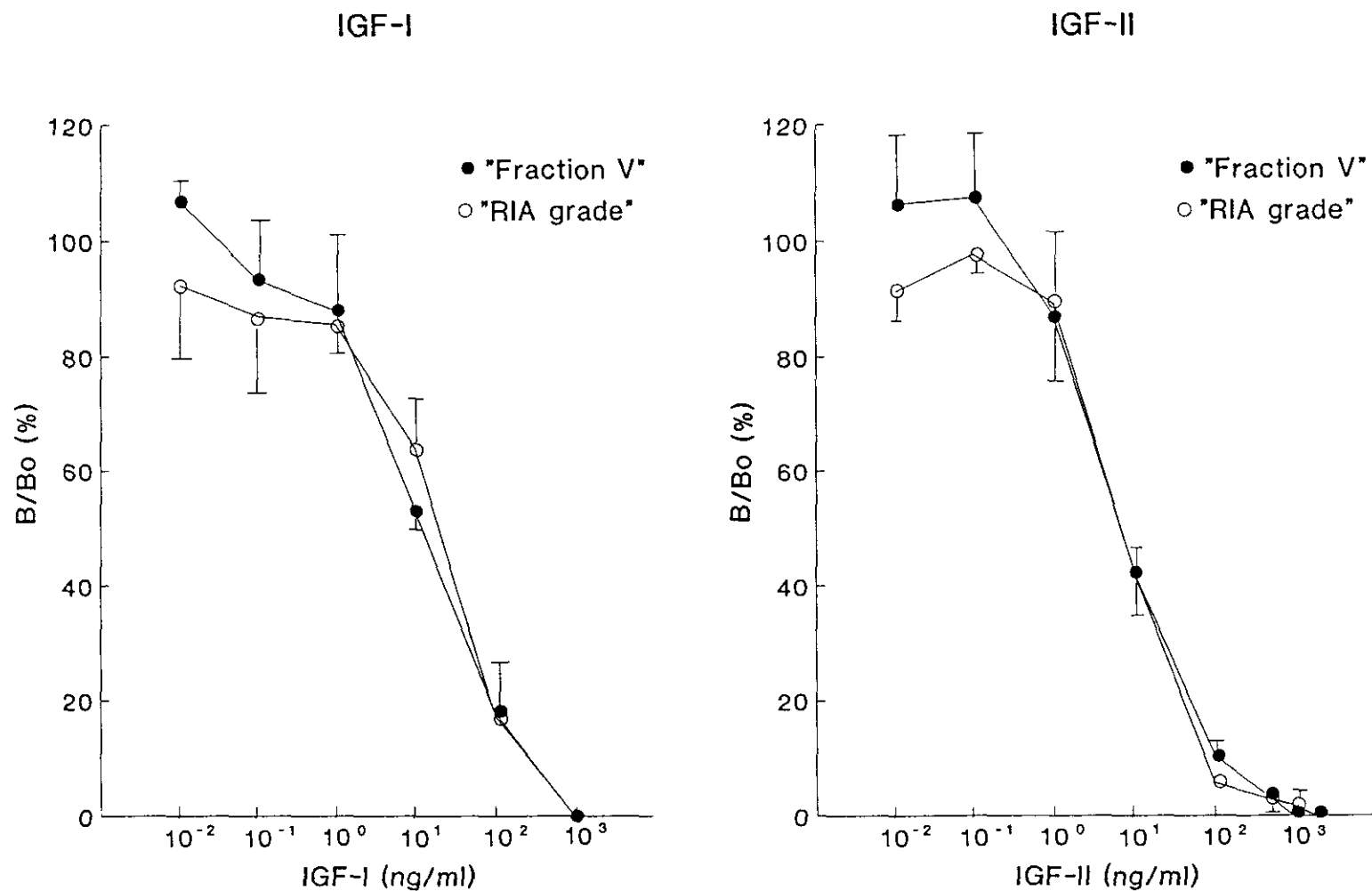
F = concentración de hormona libre;

$K_a$  = constante de afinidad;

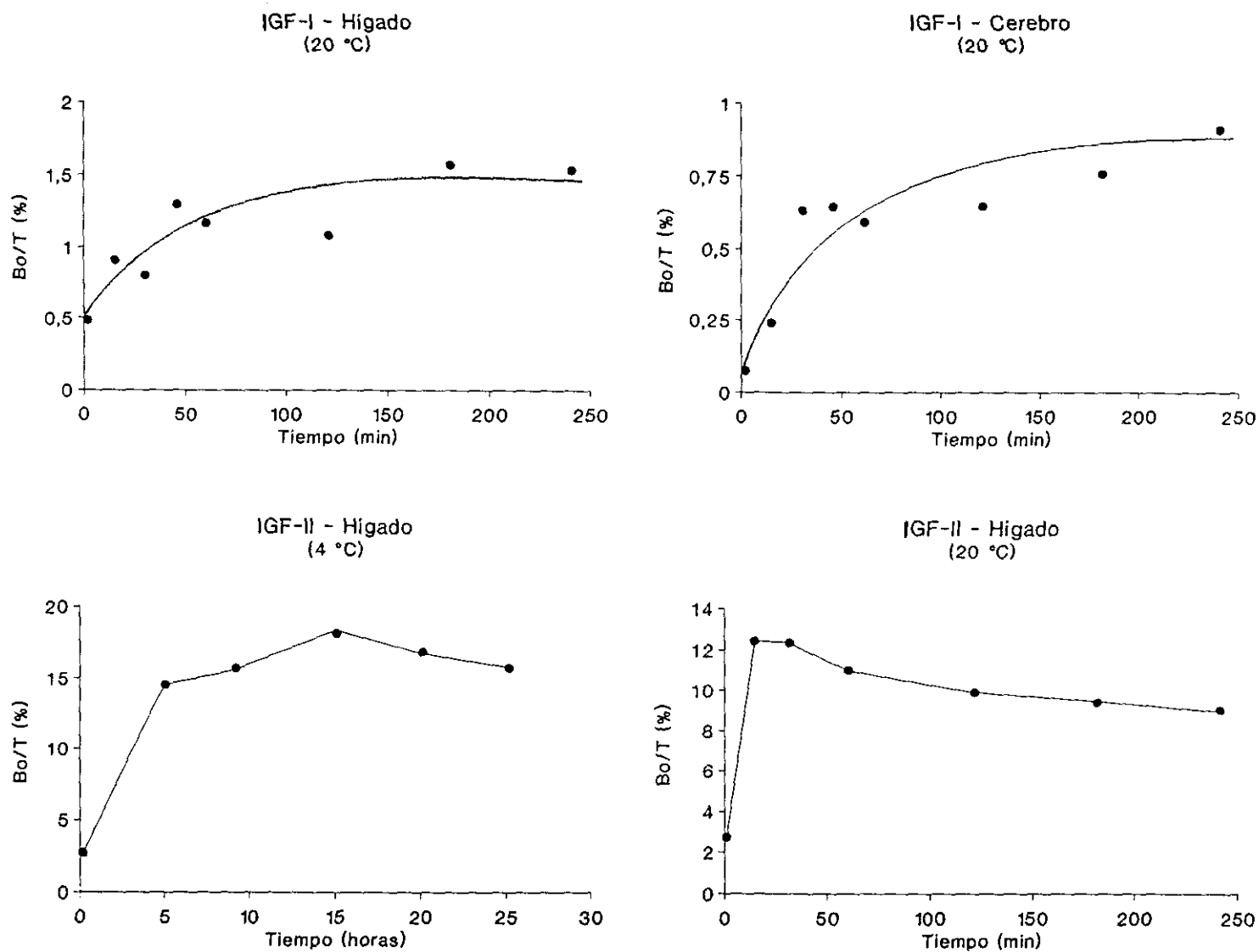
n = número total de receptores.

Se trata de la ecuación de una recta, con B/F en ordenadas y B en abscisas. El punto de corte con el eje x permite calcular n, mientras que la pendiente corresponde al valor negativo de la constante de afinidad  $K_a$ . Estos parámetros pueden determinarse a partir de curvas de desplazamiento de ligando marcado radiactivamente con ligando frío a concentraciones conocidas y crecientes.

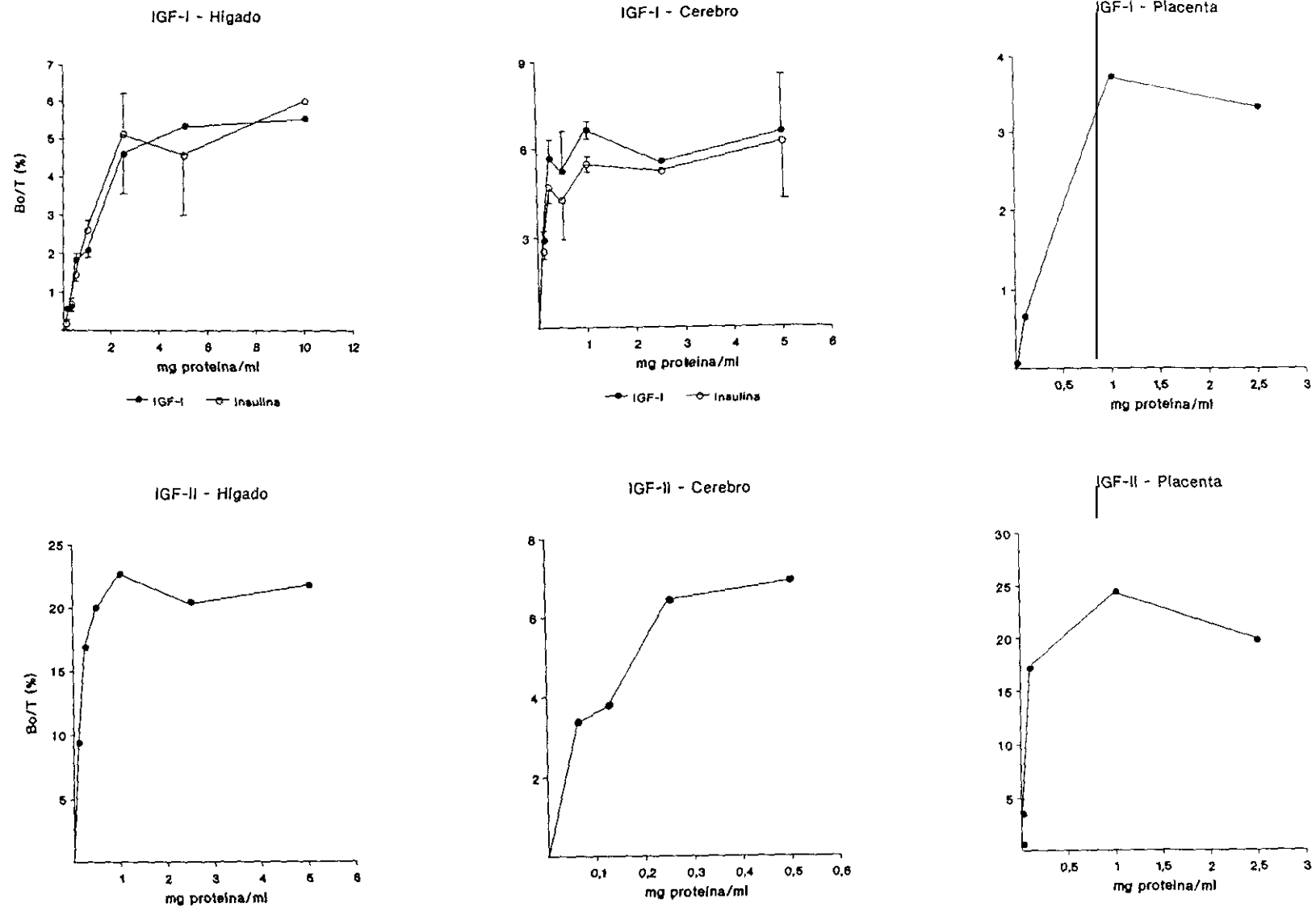
Esta ecuación implica varios supuestos que no siempre se cumplen en los sistemas biológicos, lo que complica el análisis:



**Figura 2.10.** Curvas de desplazamiento de IGF-I y II en membranas de cerebro de rata recién nacida. La concentración de proteínas de la preparación fue de 0,1 mg/ml en ambas pruebas. Se comparan dos calidades de albúmina sérica bovina (BSA) de la casa Sigma: BSA "Fraction V" y BSA "RIA-grade". Cada punto representa la media  $\pm$  DE de cuatro determinaciones efectuadas tras 15 horas de incubación a 4 °C.



**Figura 2.11.** Cinética de ligamiento de IGF-I (A) y II (B) a preparaciones de membranas de hígado y cerebro de rata recién nacida. Las pruebas se efectuaron a dos temperaturas, 4 °C y 20 °C. Las concentraciones de proteínas de las preparaciones fueron 0,2 mg/ml para IGF-II en ambos órganos, 0,1 mg/ml para IGF-I en cerebro y 1,5 mg/ml para IGF-I en hígado. Cada punto representa la media de cuatro determinaciones.



**Figura 2.12.** Efecto de la concentración de proteínas en la preparación de membranas sobre el ligamiento de IGF-I y II. Para el ligamiento de IGF-I en hígado y cerebro se emplearon tanto IGF-I (90 nM) como insulina porcina (25  $\mu$ M) para el máximo desplazamiento; en ambos casos se representan media  $\pm$  DE. Cada punto representa la media de tres determinaciones. Las condiciones de incubación fueron 15 horas a 4 °C, excepto en placenta, donde fueron 5 horas a temperatura ambiente.

a) La hormona marcada ha de ser homogénea y biológicamente idéntica a la hormona nativa.

b) El receptor ha de ser homogéneo y actuar independientemente.

c) La reacción ha de estar en el equilibrio cuando se determinan las concentraciones de hormona ligada o libre.

d) No debe haber unión específica a otros ligandos distintos del receptor.

## **2.9. Cálculos estadísticos**

### **2.9.1. Cálculos básicos.**

Los resultados se expresan como media  $\pm$  desviación estándar (DE o  $\sigma$ ). El número de datos  $n$  de cada población se detalla en cada experimento concreto. En algunos casos el resultado se presenta como coeficiente de variación, que se define como:

$$CV = \frac{\sigma}{\bar{x}} \cdot 100$$

Cuando se dispuso de poblaciones amplias se estudió la posibilidad de rechazar los datos sensiblemente alejados de la media; para ello se aplicó el test de la  $\chi^2$ . Se rechazaron los datos que caían fuera del intervalo

$$\bar{x} \pm \sqrt{\chi^2 \sum_{i=1}^{i=n} \left( \frac{\bar{x} - x_i}{n-1} \right)^2}$$

(donde  $\chi^2$  se determinó en las tablas correspondientes en función del número de datos que caían fuera del intervalo definido por la DE). A continuación se recalcularon la media y la DE.

### **2.9.2. Análisis de la varianza.**

El grado de significación estadística de la diferencia entre las medias de dos poblaciones se determinó mediante análisis de la varianza (ANOVA) de una vía (en el caso de muestras independientes) o de dos vías (en el caso de muestras apareadas).



En esencia, el ANOVA consiste en comparar las varianzas  $s_D^2$  (variabilidad de los datos dentro de cada muestra, que se debe sólo al azar) y  $s_E^2$  (variabilidad entre las muestras, que se debe al azar y, si las medias son distintas, a que las muestras proceden de poblaciones distintas) por el procedimiento de la F de Snedecor. Cuando el ANOVA es significativo se busca qué medias son iguales y cuáles distintas, para lo cual se compara la cantidad experimental

$$t_{\text{exp}} = \frac{|\bar{X}_i - \bar{X}_j|}{\sqrt{s_D^2 \left( \frac{1}{n_i} + \frac{1}{n_j} \right)}}$$

con una  $t_{\alpha}(f;k)$  con  $f$  = número de datos totales - número de grupos y  $k$  = número de comparaciones a realizar. Esta cantidad  $t_{\alpha}$  se determina en las tablas correspondientes según el test a aplicar, el cual a su vez depende del objetivo y la planificación del experimento. Una diferencia se consideró significativa a partir de  $p < 0,05$ . Para simplificar la presentación de gráficos y tablas  $p < 0,05$  y  $p < 0,01$  se denotan con un mismo símbolo.

### 2.9.3. Regresión lineal y correlación.

El análisis de regresión lineal se efectuó por el método de los mínimos cuadrados. Para verificar si la correlación obtenida es significativa se compara la cantidad experimental

$$t_{\text{exp}} = \sqrt{\frac{(n-2) r^2}{1-r^2}}$$

(donde  $r$  es el coeficiente de correlación y  $n$  el número de parejas de datos), con una  $t_{\alpha}$  de Student con  $n-2$  grados de libertad. Se consideró que había significación a partir de  $p < 0,05$ .

### **3.RESULTADOS**

### **3. RESULTADOS**

#### **3.1. Estudio comparativo de tres métodos de separación de IGFBPs del suero**

Con este estudio comparativo se pretendía validar para la rata neonatal dos métodos alternativos a la filtración en gel (FG) para la separación de las proteínas ligadoras de IGF previos a la determinación de la concentración de IGF-I: la extracción en ácido-etanol con crioprecipitación (AEC) y la extracción en ácido fórmico-acetona (FA). Para ello se empleó suero de rata que combinaba dos condiciones: edad (10, 20 y 70 días) y estado nutricional (ratas subnutridas y sus controles). La subnutrición se llevó a cabo desde el día 16 de gestación, según se describe en 2.1.2. Cada muestra fue sometida a FG, AEC y FA, determinándose a continuación la concentración de IGF-I en los extractos. Mediante "Western ligand blot" se analizaron las IGFBPs presentes tanto en el suero como en los extractos y precipitados resultantes de las extracciones, con el fin de estimar qué formas de IGFBPs son las responsables de la interferencia en el RIA y en qué cuantía.

##### **3.1.1. Niveles de IGF-I en suero.**

La figura 3.1. muestra los niveles de IGF-I en suero de ratas control y subnutridas a 10 días (periodo neonatal temprano), 20 días (periodo neonatal tardío) y 70 días (periodo adulto) de vida. Todos los extractos fueron analizados a la misma dilución en un mismo experimento. Puesto que el porcentaje de recuperación de una alícuota de  $^{125}\text{I}$ -IGF-I añadida al suero no mostró diferencias significativas utilizando cualquiera de los tres métodos de extracción, no se ha efectuado ninguna corrección de los datos.

En la rata adulta control los valores obtenidos tras tratamiento con AEC o FA fueron similares a los obtenidos tras FG; en la rata adulta subnutrida, en cambio, sólo los valores obtenidos tras AEC fueron similares a los obtenidos tras FG, proporcionando la extracción con FA valores significativamente más altos. A 10 y 20 días de vida ambos métodos de extracción alternativos a la FG proporcionaron valores significativamente superiores a los obtenidos con FG en ratas subnutridas, en tanto que en ratas controles sólo tras extracción con FA se obtuvieron resultados significativamente superiores a los que proporciona la FG.

Con FG se apreció una clara diferencia en los niveles de IGF-I entre ratas subnutridas y controles a todas las edades, con valores significativamente más altos (aproximadamente el doble) en las ratas control. Tanto en las ratas subnutridas como en las controles se produjo un progresivo incremento (estadísticamente significativo) en los niveles de IGF-I con la edad.

En cuanto a la AEC, no hubo diferencias significativas ni a 10 ni a 20 días entre las ratas subnutridas y sus controles. Sí se encontró diferencia en las ratas adultas, con valores

1,74 veces mayores en las controles que en las subnutridas. El incremento en los niveles de IGF-I con la edad que se observa en las muestras analizadas por filtración en gel sólo se observó en el paso de 20 días a adulto.

Finalmente, con la FA obtuvimos, a 10 y 20 días, valores más altos (aproximadamente el doble) en ratas subnutridas que en controles, al contrario de lo que sucedió con la filtración en gel. A 70 días no se observaron diferencias significativas entre ambas poblaciones. No se apreció un claro incremento de los niveles de IGF-I con la edad en las ratas controles, mientras que en las ratas subnutridas se dio la tendencia contraria.

### **3.1.2. Estudio de regresión lineal y correlación.**

La tabla 3.1. muestra el análisis de regresión lineal y correlación entre los valores de IGF-I obtenidos por RIA tras FG y los obtenidos tras AEC o FA.

A 10 y 20 días la correlación fue negativa en todos los casos, excepto a 10 días en ratas control tras FA. En ninguno de estos casos la correlación fue significativa. A 70 días encontramos una correlación positiva en todos los casos, pero  $r$  fue significativo ( $p < 0,05$ ) sólo en sueros tratados con AEC, tanto de ratas subnutridas como de ratas controles.

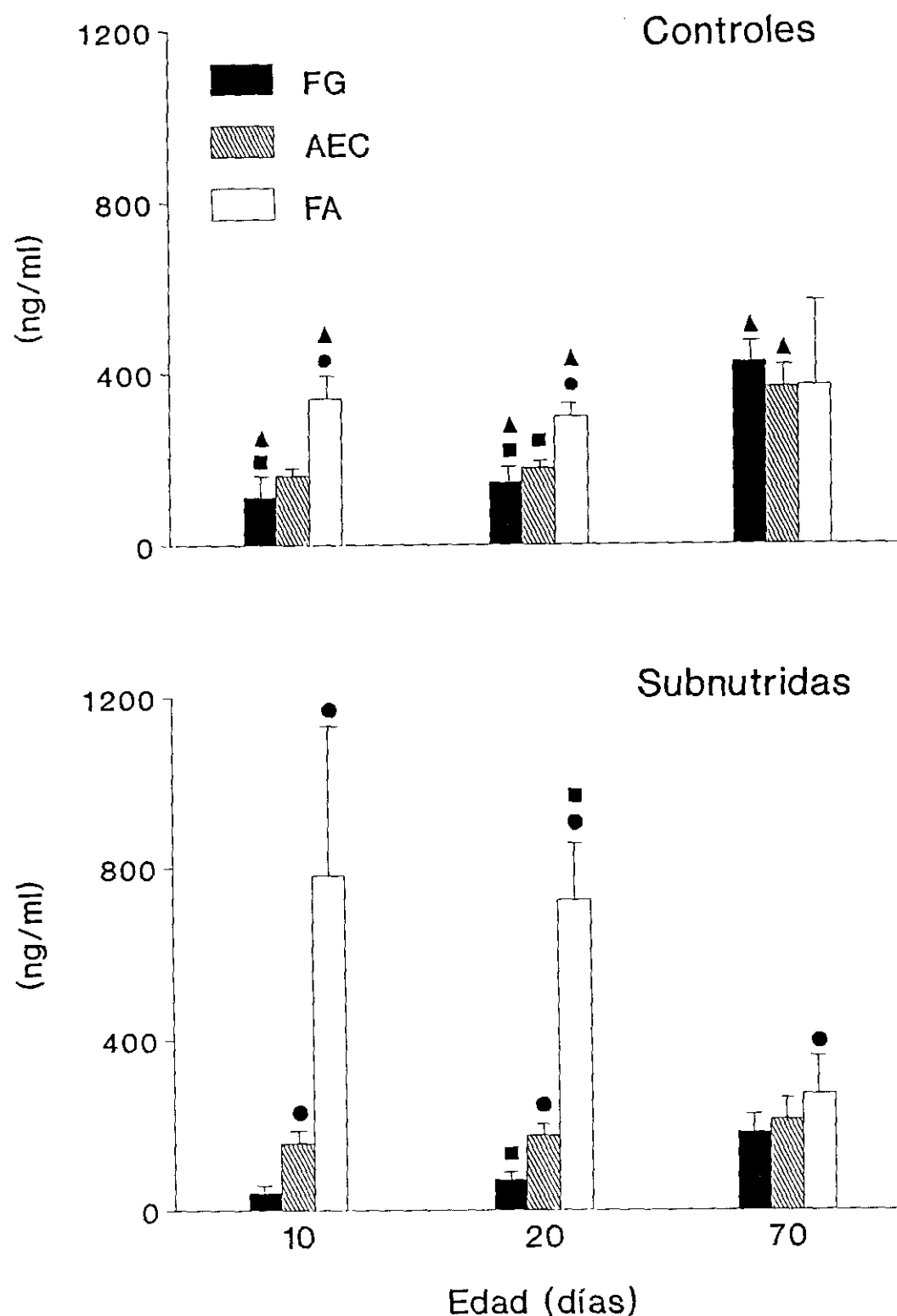
### **3.1.3. Evaluación de los métodos de separación de IGFBPs mediante "Western ligand blot".**

Se aplicó esta técnica a los tres métodos de separación que son objeto de este estudio comparativo. Por un lado analizamos todas las muestras filtradas en Sephadex® G-50, no obteniendo en ningún caso señal en las autorradiografías, lo que indica la ausencia de IGFBPs residuales y lo adecuado del método de separación. Por otro lado analizamos tanto el suero como los precipitados y extractos resultantes de la aplicación de los procedimientos de AEC y FA a esos mismos sueros; en este caso tomamos tres muestras de cada población. En un mismo gel incluimos las muestras del mismo grupo de edad y estado nutricional.

Las figuras 3.2. y 3.3. muestran las autorradiografías resultantes de estos análisis y las figuras 3.4. y 3.5. la cuantificación densitométrica de las mismas. Los resultados se han dispuesto de tal manera que la figura 3.2. muestra las IGFBPs presentes en suero y extractos, y la figura 3.3. las IGFBPs presentes en suero y precipitados.

#### **3.1.3.1. Autorradiografías.**

El estudio del suero de rata mediante "Western ligand blot" mostró tres grupos principales de bandas, con pesos moleculares aproximados de 24 kDa, 30 kDa y un grupo



**Figura 3.1.** Niveles de IGF-I en suero de ratas subnutridas y controles de 10, 20 y 70 días determinados por RIA tras separación de las IGFBPs mediante filtración en gel (FG), extracción con ácido-etanol y crioprecipitación (AEC) y extracción con ácido fórmico-acetona (FA). Media  $\pm$  DE de 6 - 7 animales. ● Significación estadística con respecto a los valores obtenidos por FG. ■ Significación estadística con respecto al grupo de edad inmediatamente superior. ▲ Significación estadística con respecto a los animales subnutridos de la misma edad.

**Tabla 3.1.** *Análisis de regresión lineal y correlación de los valores de IGF-I en suero obtenidos en el RIA de muestras de ratas de 10, 20 (n = 6) y 70 (n = 7) días, controles y subnutridas, extraídos por filtración en gel (FG), extracción en ácido-etanol con crioprecipitación (AEC) o extracción en ácido fórmico-acetona (FA).*

Población		AEC frente a GF	FA frente a GF
10 días	Subnutridas	$y = 200,40 - 1,07x$ $r = -0,5063$ NS	$y = 2046,78 - 30,65x$ $r = -0,7542$ NS
	Controles	$y = 170,26 - 0,12x$ $r = -0,2728$ NS	$y = 303,37 + 0,32x$ $r = 0,2607$ NS
20 días	Subnutridas	$y = 234,44 - 0,85x$ $r = -0,7855$ NS	$y = 1028,86 - 4,31x$ $r = -0,5148$ NS
	Controles	$y = 179,63 - 0,04x$ $r = -0,0918$ NS	$y = 299,72 - 0,04x$ $r = -0,0439$ NS
70 días	Subnutridas	$y = -2,90 + 1,18x$ $r = 0,8601$ $p < 0,05$	$y = 179,67 + 1,72x$ $r = 0,7468$ NS
	Controles	$y = -69,01 + 1,02x$ $r = 0,7968$ $p < 0,05$	$y = -221,85 + 1,39x$ $r = 0,2898$ NS

NS: No significativa.

entre 40 y 50 kDa (IGFBP-3) que en algunas de las autorradiografías aparece como doblete.

Tanto los animales subnutridos como sus controles mostraron un incremento en IGFBP-3 sérico con la edad; sin embargo, la intensidad de las bandas correspondientes a IGFBP-3 fue menor en los animales subnutridos que en sus controles a todas las edades. Por el contrario, la banda de 30 kDa fue claramente más intensa en el suero de las ratas subnutridas que en el de sus controles a todas las edades, y disminuyó con la edad en ambas poblaciones. La intensidad de la banda de 24 kDa también disminuyó con la edad, tanto en ratas subnutridas como en controles. Estos resultados muestran diferencias tanto cuantitativas como cualitativas en las IGFBPs del suero cuando se comparan ambas poblaciones (controles y subnutridas) a lo largo del desarrollo postnatal.

### **3.1.3.2. Análisis densitométrico.**

Como sugieren las autorradiografías, el tipo y la proporción de IGFBPs eliminadas del suero difiere según el tratamiento aplicado, a lo que hay que añadir los cambios que en las diferentes especies de IGFBPs tienen lugar a lo largo del desarrollo y con el estado nutricional. Puesto que las distintas formas de IGFBPs muestran diferentes afinidades por IGF-I, concentraciones similares de diferentes proteínas, analizadas mediante "Western ligand blot", no generan necesariamente imágenes de similar densidad óptica en las autorradiografías. Por este motivo cuantificamos cada banda por separado y expresamos el resultado como tanto por ciento de la densidad óptica de cada banda con respecto a la densidad óptica total en el suero correspondiente. Esto último permite además hacer comparables entre sí los resultados de las distintas autorradiografías.

En las figuras 3.4. y 3.5. se han representado por separado los resultados obtenidos en extractos y precipitados.

#### **3.1.3.2.1. IGFBP 40-50 kDa.**

Tanto la extracción en AE como la extracción en FA eliminaron la mayor parte de IGFBP-3 en todas las poblaciones. En algunos extractos no se detectó IGFBP-3; es el caso del extracto FA en ratas adultas, tanto subnutridas como controles, o el extracto AEC en ratas subnutridas de 10 y 70 días. Curiosamente, en el extracto FA de ratas subnutridas de 10 y 20 días la densidad óptica fue significativamente superior a la del suero. Esto quizá sea un efecto de las condiciones del propio método de extracción sobre la IGFBP, de modo que su capacidad de ligamiento de IGF-I se ve alterada; no puede descartarse tampoco que se trate de un artefacto debido a un efecto de concentración de la muestra en el momento de la preparación para la electroforesis.

Como se desprende de la figura 3.5., la eficacia de la extracción AE (sin crioprecipitación) de la extracción FA fueron muy similares; la contribución del paso de crioprecipitación a la extracción AE fue escasa o nula en este grupo de bandas.

#### **3.1.3.2.2. IGFBP 30 kDa.**

A 30 kDa permanecieron, con ambos métodos, cantidades importantes de IGFBP en los extractos (Fig. 3.4.). Mientras que en la rata control a 10 y 20 días la proporción de IGFBP de 30 kDa remanente en el extracto AEC fue mayor que la remanente en el extracto FA, en la rata subnutrida se dio la situación contraria. En la rata adulta la eficacia de ambos métodos fue también variable según el estado nutricional: en ratas subnutridas la extracción AEC dejó una proporción significativamente menor de IGFBP de 30 kDa que la extracción FA; en ratas adultas sucedió lo contrario.

A la alta proporción de IGFBP remanente en los extractos se corresponde la baja proporción de IGFBP en los precipitados que muestra la figura 3.5. Un dato llamativo es la alta proporción de IGFBP remanente en el crioprecipitado del suero de ratas subnutridas de 20 días (67% con respecto a la misma banda del suero), y que sugiere la presencia en el suero de este tipo de ratas de una cantidad anormalmente elevada de alguna forma de IGFBP que no está presente en ratas controles de la misma o de otras edades.

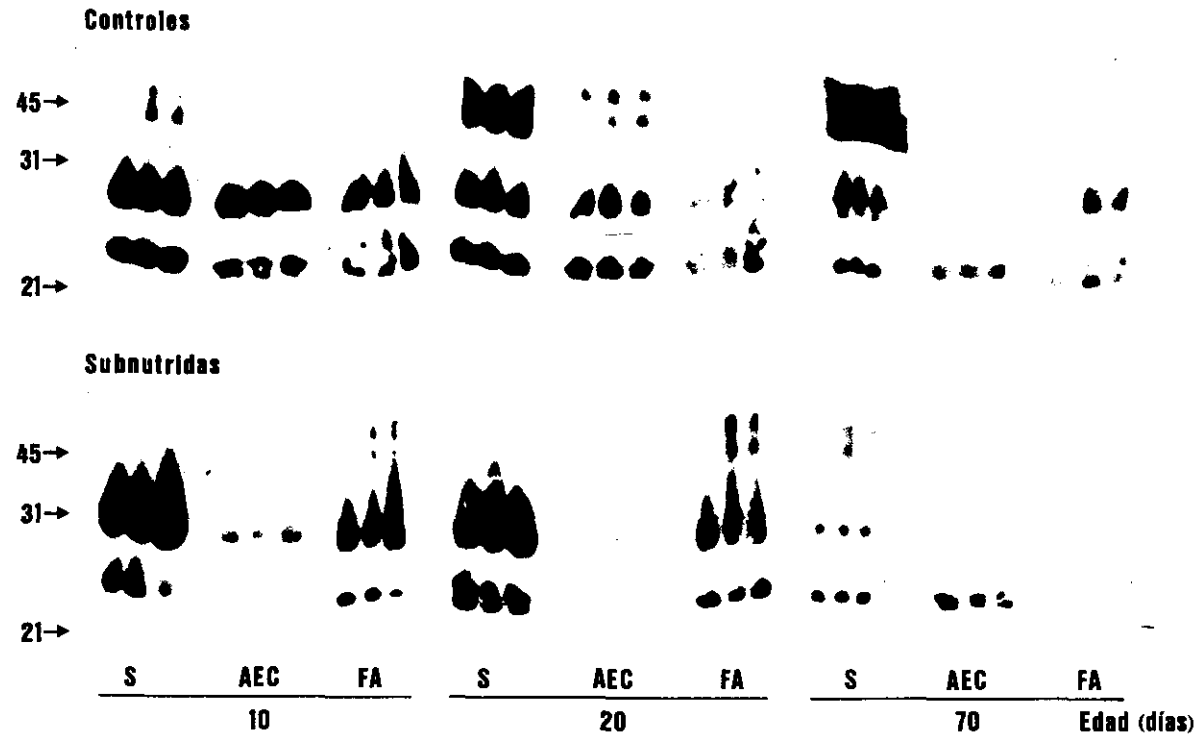
#### **3.1.3.2.3. IGFBP 24 kDa.**

En la banda de 24 kDa el resultado obtenido con la AEC y con la FA fue muy similar al que se observó a 30 kDa. En los animales control la proporción de IGFBP remanente en los extractos fue similar con ambos métodos (AEC y FA), y osciló entre el 37% a 10 días y el 100% a 70 días, con respecto a la IGFBP del suero.

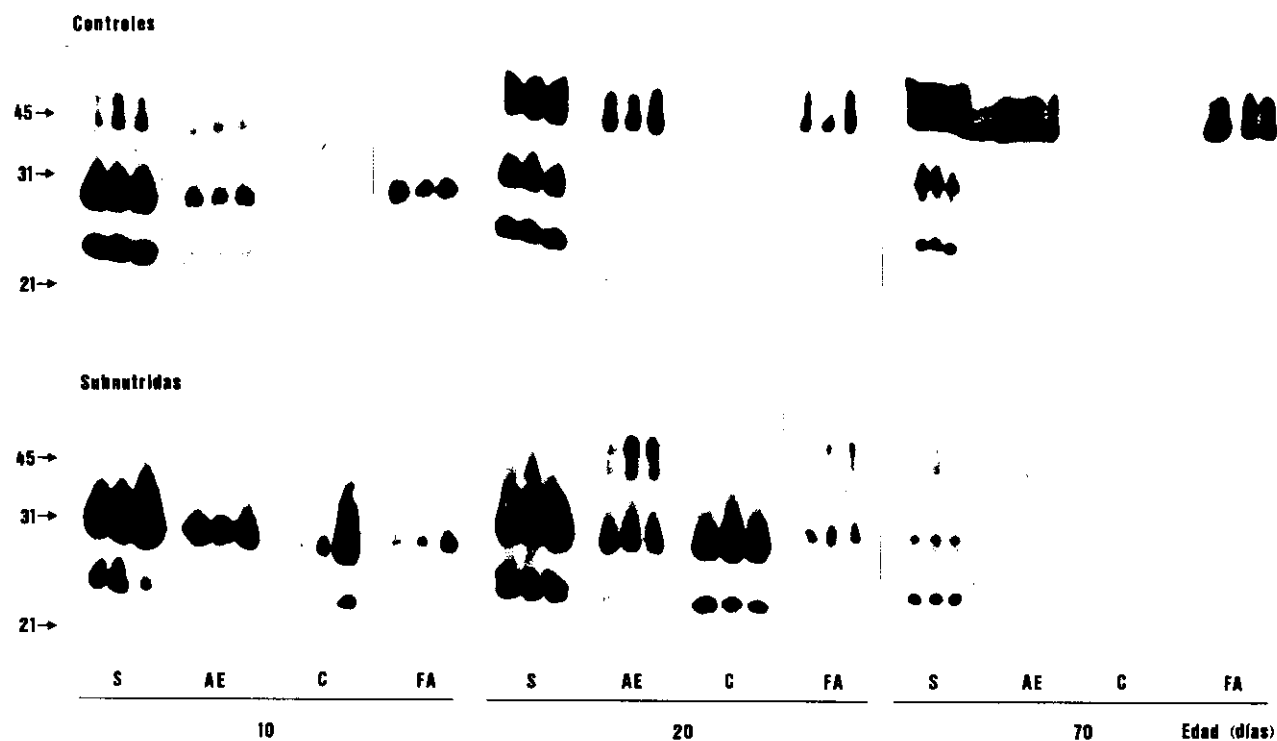
En los animales subnutridos no se detectó esta banda en los extractos AEC a 10 y 20 días; en cambio, a 70 días, la cantidad detectada fue similar a la presente en el suero. Por lo que respecta a la extracción FA, la proporción detectada fue significativamente inferior a la presente en el suero a 70 días, y no difirió significativamente a 10 y 20 días.

La figura 3.5. muestra que la proporción de la banda de 24 kDa en los precipitados es escasa en todas las poblaciones, y muy similar cuando se comparan ambos métodos de extracción. Análogamente a lo que sucedía con las bandas de 40-50 kDa, la contribución del paso de crioprecipitación es escasa o nula; sólo en el grupo de ratas subnutridas de 20 días la proporción de la IGFBP de 24 kDa en el crioprecipitado es destacada (42% con respecto a la IGFBP de 24 kDa del suero), paralelamente a lo que sucedía en la banda de 30 kDa.

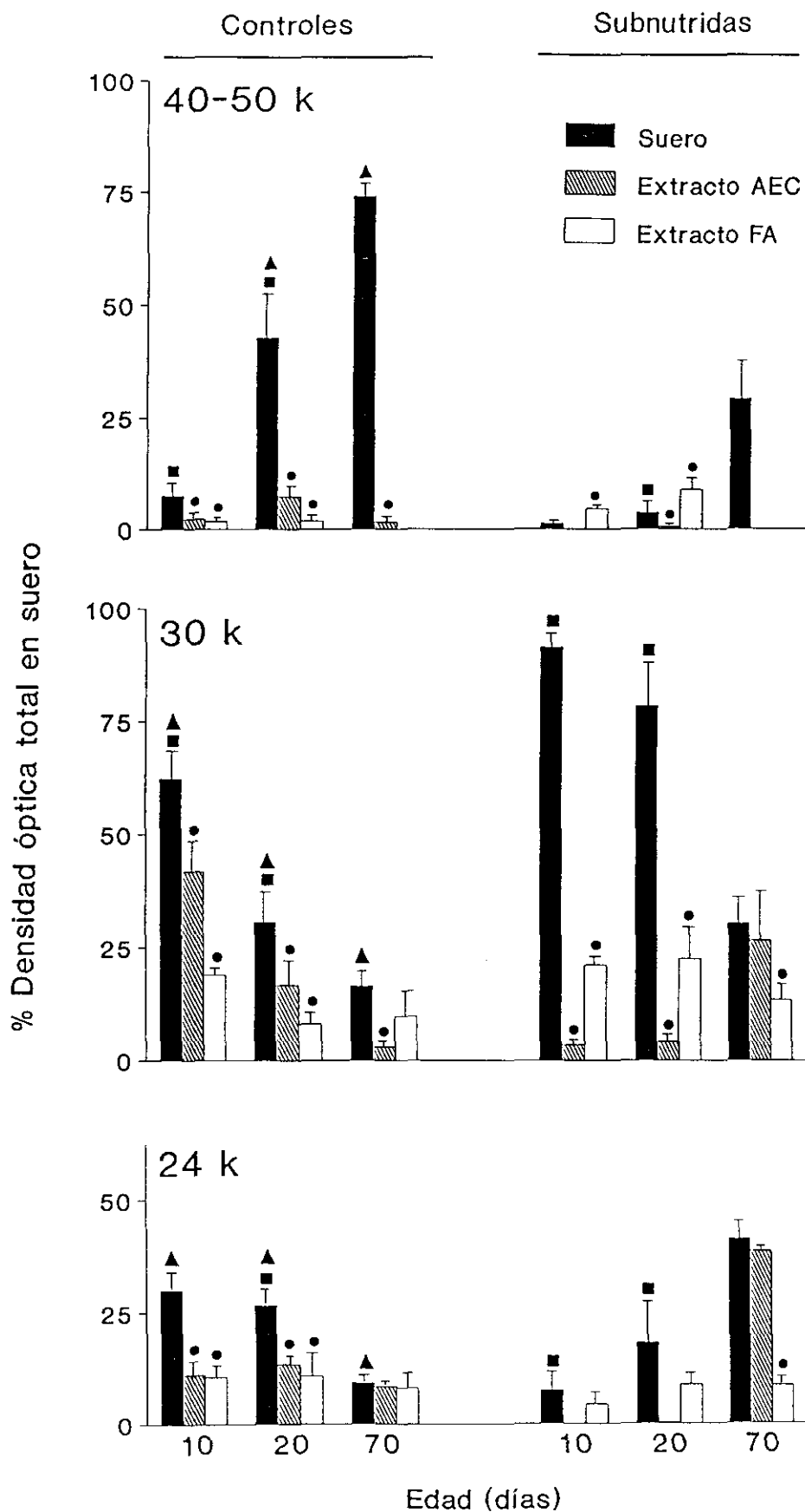




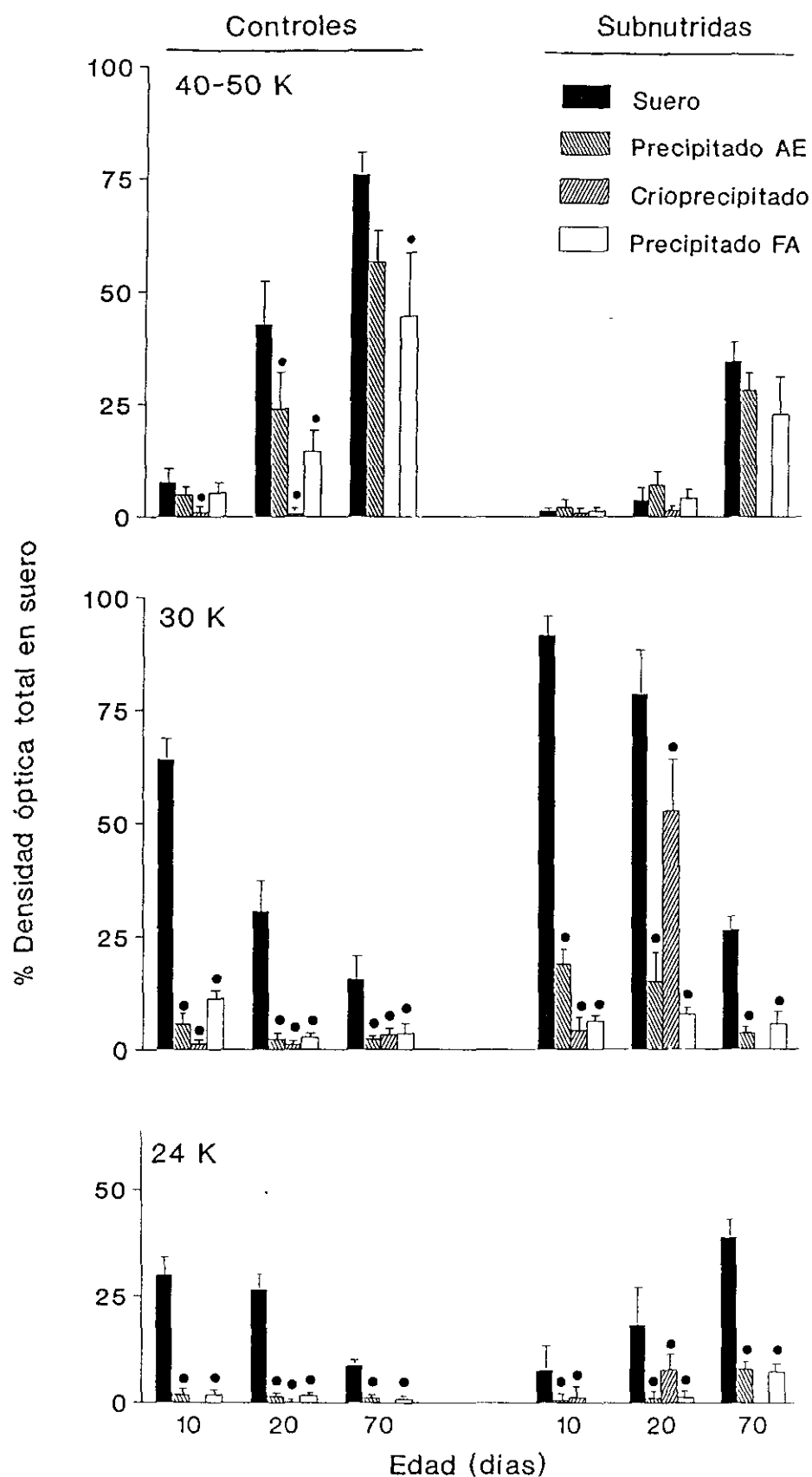
**Figura 3.2.** Análisis mediante "Western ligand blot" de las IGFBPs presentes en 3  $\mu$ l de suero (S) y el volumen equivalente de extractos del mismo suero tratado por extracción con ácido-etanol y crioprecipitación (AEC) o extracción con ácido fórmico-acetona (FA). Se analizaron 3 muestras de cada población de animales subnutridos y controles de 10, 20 y 70 días. Las membranas fueron incubadas con  $10^6$  cpm de  $^{125}$ I-IGF-I; el tiempo de exposición fue de 66 horas.



**Figura 3.3.** Análisis mediante "Western ligand blot" de las IGFBPs presentes en 3  $\mu$ l de suero (S) y el volumen equivalente de precipitados del mismo suero tras extracción con ácido-etanol (AE), crioprecipitación (C) y extracción con ácido fórmico-acetona (FA). Mismas muestras y mismas condiciones que en la figura 3.2.



**Figura 3.4.** Cuantificación densitométrica de las autorradiografías de la figura 3.2. (IGFBPs en suero y extractos). El resultado se expresa como tanto por ciento de la densidad óptica total en el suero correspondiente. ● Significación estadística con respecto al suero. ■ Significación estadística con respecto al suero del grupo de edad inmediatamente superior. ▲ Significación estadística con respecto al suero de los animales subnutridos de la misma edad.



**Figura 3.5.** Cuantificación densitométrica de las autorradiografías de la figura 3.3. (IGFBPs en suero y precipitados). El resultado se expresa como tanto por ciento de la densidad óptica total en el suero correspondiente. ● Significación estadística con respecto al suero.

### **3.2. Subnutrición y diabetes en periodo fetal**

Para esclarecer el papel de los nutrientes y la insulina en el desarrollo de la rata en etapa fetal realizamos un estudio en ratas gestantes y sus fetos al final de la gestación empleando dos modelos experimentales: restricción alimentaria y diabetes por STZ. Un grupo de ratas gestantes fue sometido a restricción alimentaria desde el día 14 o 16 de gestación, y otro grupo recibió STZ el día 14 o 16 de gestación. Las gestantes fueron sacrificadas a 17, 18, 19 y 21 días cuando la restricción alimentaria comenzó el día 16, y a 18, 19 y 21 días cuando la administración de STZ se efectuó el día 16. Las ratas que recibieron STZ el día 14 y las que fueron subnutridas desde el día 14 fueron sacrificadas el día 17. Estos periodos de tiempo entre la instauración de la restricción alimentaria o la administración de STZ y los sacrificios se establecieron con la finalidad de permitir la actuación tanto de la subnutrición como del fármaco sobre la gestante y los fetos.

#### **3.2.1. Evolución del peso corporal en la rata gestante.**

En la figura 3.6. se representa, por separado, la evolución del peso corporal en las ratas gestantes subnutridas y diabéticas y sus controles alimentados *ad libitum*, expresada como tanto por ciento de incremento con respecto al peso al inicio del experimento (día 14 de gestación), en que se asignó a este parámetro un valor de 100%. En las gestantes control se produjo un incremento progresivo y lineal del peso de aproximadamente un 21 % a lo largo de esta etapa de la gestación.

Las ratas subnutridas, tanto desde el día 14 como desde el día 16, experimentaron una pérdida de peso de aproximadamente un 4% al día siguiente de instaurarse la subnutrición. Posteriormente las ratas subnutridas desde el día 14 mantuvieron su peso hasta el día 17, en que fueron sacrificadas; las ratas subnutridas desde el día 16 mostraron un ligero incremento del peso corporal a partir del día 17, de modo que la ganancia de peso fue, al final del experimento, de un 4,8% con respecto al día 14 (aproximadamente un 16% menos, por lo tanto, de la encontrada en las controles). En ambos grupos de ratas subnutridas las diferencias en la evolución del peso corporal con respecto a las ratas control fueron estadísticamente significativas desde el día siguiente del inicio de la restricción alimentaria hasta el final del periodo de estudio.

A diferencia de lo que sucedió en las ratas subnutridas, en las ratas tratadas con STZ no se produjo, al día siguiente del tratamiento, una pérdida de peso, sino una detención en la ganancia de peso. Posteriormente se observó un claro aumento del peso corporal en las ratas inyectadas el día 16, que alcanzaron, al final del periodo de estudio, un 14,4% de incremento con respecto al día 14 (aproximadamente un 7% menos del incremento que se observó en las controles); en este grupo de ratas el incremento del peso corporal fue significativamente inferior al de las ratas control desde el día siguiente a la administración

de STZ. Las ratas inyectadas el día 14 habían incrementado su peso tan solo un 3,1% el día 17, cuando fueron sacrificadas; esta cifra fue significativamente inferior a la de las ratas control a 17 días, que habían incrementado su peso en un 8% con respecto al día 14.

### **3.2.2. Glucemia e insulinemia en la rata gestante.**

La tabla 3.2. recoge los resultados de la determinación de la glucemia y la insulinemia en las ratas gestantes de este estudio. La glucemia se determinó en sangre del extremo de la cola en estado postabsortivo, a las 5 horas de habersele retirado el alimento a las ratas controles y diabéticas o de haber ingerido la ración las ratas subnutridas. La glucemia de las gestantes control apenas experimentó variaciones a lo largo del periodo de estudio, manteniéndose en torno a 50 mg/100 ml. No se observaron diferencias significativas con la glucemia de las gestantes subnutridas, pero sí con la de las que habían recibido STZ, cuyos valores fueron muy superiores (hasta 8 veces) en todas las etapas.

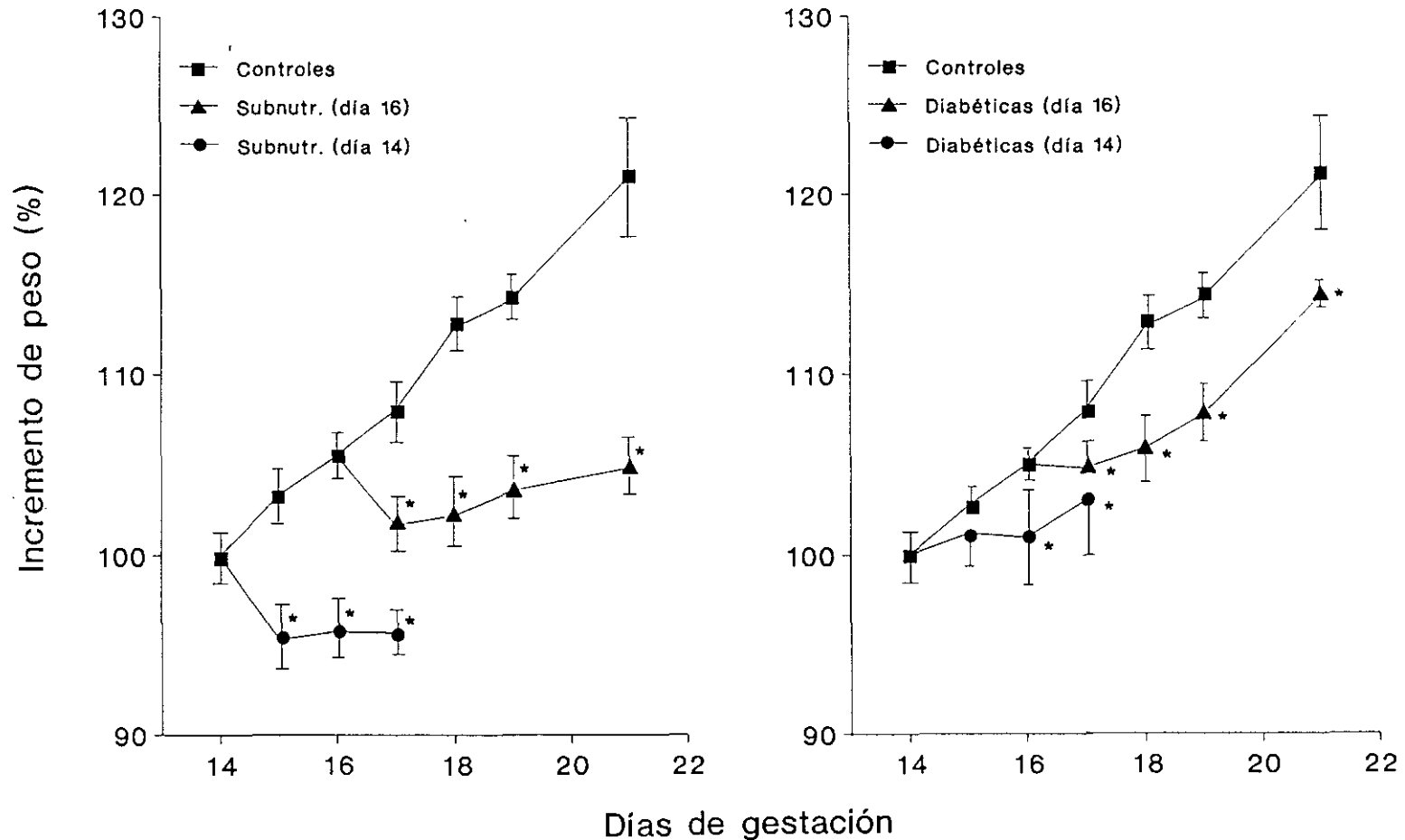
Por lo que respecta a la insulinemia, las ratas control mantuvieron unos niveles entre 2,7 y 3,0 ng/ml a lo largo del periodo de estudio. Las ratas subnutridas, tanto desde el día 14 como desde el día 16, no presentaron diferencias significativas con sus respectivos controles en este parámetro en ninguno de los estadios estudiados. En cambio las ratas que recibieron STZ presentaron unos niveles de insulina en suero significativamente más bajos que los de sus controles tanto a 17 días (cuando la rata fue inyectada el día 14), en que la insulinemia fue aproximadamente el 75% de la control, como a 18, 19 y 21 días (cuando la rata fue inyectada el día 16), en que osciló entre el 54 y el 62% de la control.

### **3.2.3. Niveles de IGF-I en suero de rata gestante.**

La figura 3.7. muestra los niveles de IGF-I en suero de ratas gestantes subnutridas (Fig. 3.7.A) y diabéticas (Fig. 3.7.B) en comparación con sus controles de la misma edad. Se determinó también la concentración de IGF-I en el suero de un grupo de ratas hembra adultas vírgenes. Durante el periodo de la gestación que es objeto de este estudio los niveles de IGF-I circulante en la rata control se mantuvieron significativamente más bajos que los encontrados en la rata virgen (unas 2,5 veces entre 17 y 19 días y unas 5 veces a 21 días). Entre 17 y 19 días los niveles de IGF-I se mantienen invariables en torno a 200 ng/ml; entre 19 y 21 días se produce un descenso estadísticamente significativo en este parámetro de aproximadamente un 50%.

Cuando el tratamiento comenzó el día 16 no encontramos diferencias significativas con respecto a las ratas control ni en las ratas subnutridas ni en las diabéticas en ninguno de los estadios estudiados, evolucionando los niveles de IGF-I de manera paralela a los de las gestantes del grupo control. Por el contrario, cuando el tratamiento comenzó el día 14 la concentración de IGF-I circulante fue significativamente más elevada (un 36,7%) que la

## Evolución del peso corporal. Rata gestante



**Figura 3.6.** Evolución del peso corporal de ratas gestantes subnutridas (A) y diabéticas (B) y sus controles alimentadas ad libitum, a lo largo del último tercio de la gestación. La variación del peso se expresa como tanto por ciento del peso al inicio del experimento (día 14), en que se asigna a este parámetro un valor de 100%. Con un asterisco se señala la significación estadística con respecto a las gestantes control. Cada punto representa la media  $\pm$  DE de 5 a 8 animales.

**Tabla 3.2.** Glucemia e insulinemia de ratas gestantes subnutridas, diabéticas y controles alimentadas ad libitum, y sus fetos. Los tratamientos comenzaron el día 16, salvo donde se indique otra cosa.

Días de gestación		Gestantes		Fetos	
		Glucemia (mg/100 ml)	Insulinemia (ng/ml)	Glucemia (mg/100 ml)	Insulinemia (ng/ml)
17	Subnutridas (desde día 14)	53,0 ± 5,7	2,92 ± 0,82	51,5 ± 9,8	4,10 ± 0,43
	Subnutridas	65,1 ± 2,2	2,71 ± 0,91	57,4 ± 1,8	4,11 ± 0,40
	Controles	48,0 ± 7,4	3,04 ± 0,57	49,4 ± 9,4	4,08 ± 0,52
	Diabéticas (desde día 14)	404,9 ± 44,9 <sup>a</sup>	2,23 ± 0,59 <sup>a</sup>	355,2 ± 56,7 <sup>a</sup>	2,58 ± 0,24 <sup>a</sup>
18	Subnutridas	65,7 ± 6,4	2,51 ± 0,78	63,7 ± 10,1	5,11 ± 0,72 <sup>b</sup>
	Controles	48,0 ± 7,4	2,72 ± 0,92	49,0 ± 7,2	5,44 ± 0,85 <sup>b</sup>
	Diabéticas	388,1 ± 65,7 <sup>a</sup>	1,49 ± 0,68 <sup>a</sup>	299,5 ± 18,6 <sup>a</sup>	4,30 ± 0,91
19	Subnutridas	52,8 ± 9,4	2,69 ± 1,22	67,1 ± 10,4	9,51 ± 2,19 <sup>b</sup>
	Controles	48,0 ± 8,4	2,76 ± 0,15	45,5 ± 5,2	8,83 ± 1,95 <sup>b</sup>
	Diabéticas	393,4 ± 34,0 <sup>a</sup>	1,50 ± 0,37 <sup>a</sup>	296,7 ± 16,5 <sup>a</sup>	4,60 ± 1,38 <sup>a,b</sup>
21	Subnutridas	56,4 ± 5,6	2,71 ± 0,80	42,0 ± 4,6	18,28 ± 5,39 <sup>a</sup>
	Controles	54,0 ± 10,4	2,84 ± 0,55	37,9 ± 3,6	13,40 ± 1,23
	Diabéticas	439,3 ± 112,7 <sup>a</sup>	1,75 ± 0,33 <sup>a</sup>	373,6 ± 14,0 <sup>a</sup>	10,51 ± 1,32 <sup>a</sup>

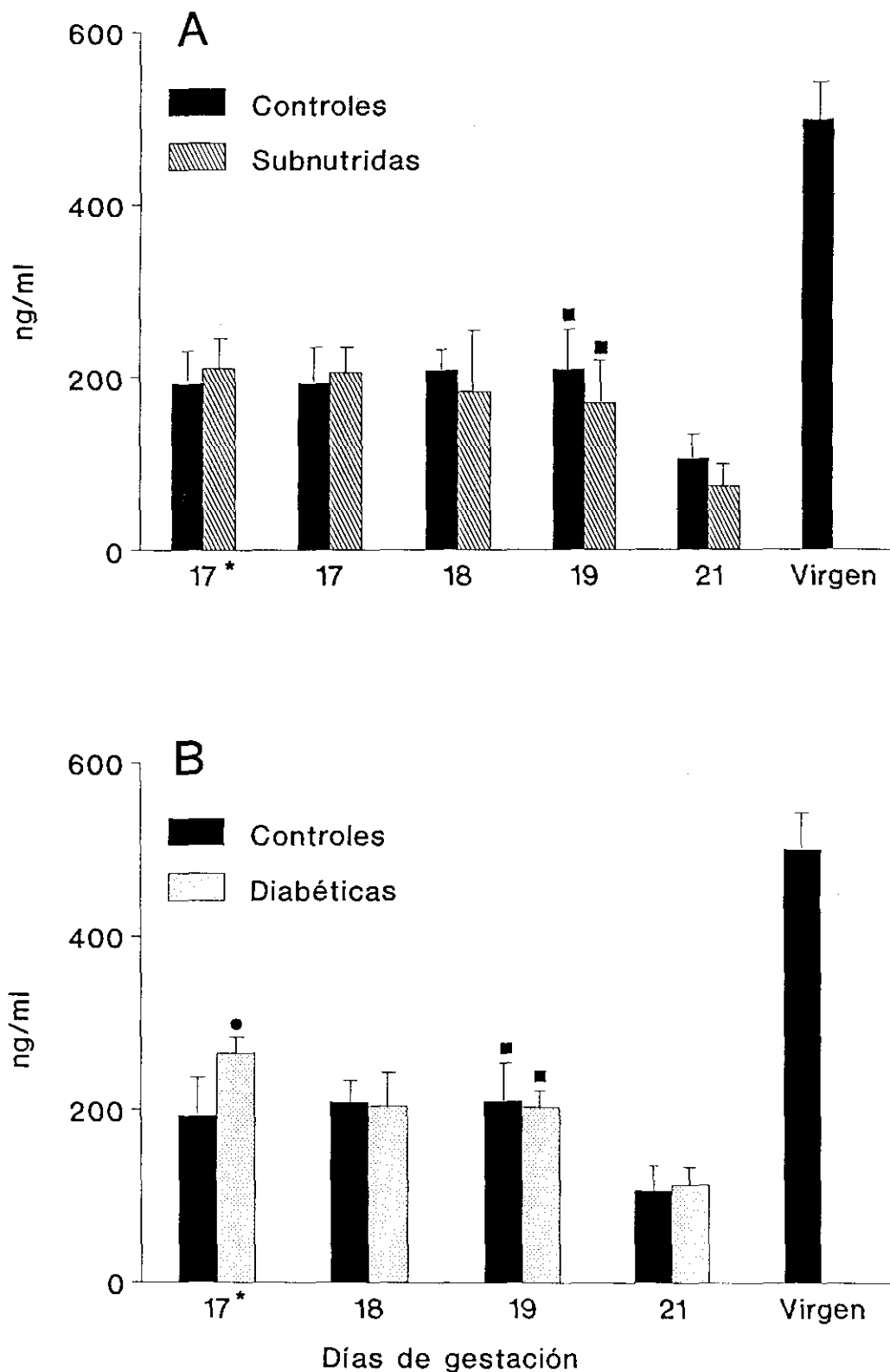
Media ± DE de 5 a 8 animales.

<sup>a</sup> Significación estadística con respecto al grupo control.

<sup>b</sup> Significación estadística con respecto al grupo de edad inmediatamente superior.



# IGF-I Rata gestante



**Figura. 3.7.** Niveles de IGF-I en suero de ratas gestantes subnutritas (A) y diabéticas (B) y sus controles alimentadas ad libitum, a lo largo del último tercio de la gestación. Inicio del tratamiento el día 16 de gestación, excepto \*, en que se inició el día 14. A la derecha, concentración de IGF-I en el suero de un grupo de 6 hembras vírgenes adultas. Media  $\pm$  DE de 5 a 8 animales. ● Significación estadística con respecto al grupo control. ■ Significación estadística con respecto al grupo de edad inmediatamente superior.

de las controles en las gestantes que recibieron STZ y no difirió significativamente en las subnutridas.

#### **3.2.4. Análisis de las IGFBPs del suero de rata gestante.**

Las IGFBPs del suero de las ratas gestantes objeto de este estudio se analizaron mediante "Western ligand blot". Posteriormente se hizo un estudio comparativo empleando "Western ligand blot" y "Western immunoblot" para identificar IGFBP-2. Debido a la menor cantidad de IGFBPs presentes en el suero de la rata gestante en comparación con la rata no gestante, fue necesario aplicar mayor cantidad de muestra a los geles (el equivalente a 4  $\mu$ l de suero, frente a los 2,5  $\mu$ l que se aplican habitualmente con otro tipo de muestras) y en algunos casos prolongar el tiempo de exposición de las películas.

##### **3.2.4.1. "Western ligand blot".**

La figura 3.8. muestra el resultado del análisis efectuado en las distintas poblaciones de ratas. Las muestras de ratas subnutridas, diabéticas y controles de la misma edad se analizaron en un mismo gel. Como se observa en esta figura, el patrón de bandas del suero de la rata gestante se caracteriza por un marcado descenso de la intensidad de las bandas de 40-50 kDa, que son prácticamente indetectables. La mayor parte de la IGFBP detectable mediante "Western ligand blot" está constituida por un grupo de 3 bandas de 30, 28 y 27 kDa, además de una banda intensa de 24 kDa.

##### **3.2.4.2. Análisis comparativo mediante "Western ligand blot" y "Western immunoblot".**

El resultado del estudio comparativo de las IGFBPs del suero mediante "Western ligand blot" y "Western immunoblot" se muestra en la figura 3.9. En el mismo gel se analizó el equivalente de 4  $\mu$ l de suero de dos muestras de cada población (ratas subnutridas, controles y diabéticas), agrupadas por edades (18, 19 y 21 días). En la membrana de nitrocelulosa se efectuaron sucesivamente el análisis mediante "ligand blot" y el análisis mediante "immunoblot" con antisuero anti-bIGFBP-2. Este antisuero fue el único de los cuatro ensayos que dio reacción cruzada con las IGFBPs del suero de rata (Ver 2.7.7. y Fig. 2.9.).

En el análisis mediante "Western ligand blot" se observa el patrón de bandas característico de la rata gestante comentado en el epígrafe anterior. El análisis mediante "Western immunoblot" muestra claramente en todas las muestras una banda de aproximadamente 30 kDa que corresponde, al menos en parte, a la banda del mismo peso molecular aparente del "ligand blot". El fondo relativamente alto que se obtuvo en esta

membrana tras el análisis mediante "immunoblot" se debe a que fue necesario prolongar el tiempo de revelado para obtener una señal adecuada.

#### **3.2.4.3. Cuantificación densitométrica.**

El resultado de la cuantificación densitométrica de las autorradiografías de la figura 3.8. se ha expresado (Tabla 3.3.) como tanto por ciento de la densidad óptica de las distintas bandas o grupos de bandas con respecto a la densidad óptica total del suero correspondiente. El grupo de bandas en torno a 30 kDa se cuantificó conjuntamente, ya que en algunas autorradiografías la resolución de las tres bandas no era buena. Se eligió esta manera de expresar los resultados debido a que cada estadio se analizó en geles independientes y no se corrió en ellos una muestra que sirviera para comparar entre sí los resultados de cada membrana.

Salvo a 17 días, donde la intensidad de las bandas de 30 kDa predomina sobre la de la banda de 24 kDa, la densidad óptica total se distribuye aproximadamente a partes iguales entre ambos grupos de bandas. Las bandas de 40-50 kDa sólo fueron detectables a 17 días. En las gestantes subnutridas de 17 días la proporción de las bandas de 30 kDa y de 40-50 kDa fue significativamente inferior a la de sus controles, al contrario de lo que sucedió con la banda de 24 kDa. En las gestantes diabéticas de 19 días sucedió lo contrario con las bandas de 30 y 24 kDa.

Se cuantificó por separado la banda correspondiente, al menos en parte, a IGFBP-2. Esta banda constituyó, en todos los estadios, entre un 25 y un 35% aproximadamente de la densidad óptica total del suero (no se muestran los resultados), y no difirió significativamente entre las distintas poblaciones de ratas gestantes en ninguno de los estadios estudiados.

#### **3.2.5. Resumen de los resultados obtenidos en ratas gestantes.**

Tanto la subnutrición como la diabetes por STZ (modelos desde 16 días de gestación) provocaron en la rata gestante una reducción en la ganancia de peso, más marcada en el modelo de subnutrición. Ni la glucemia ni la insulinemia se vieron alteradas en las gestantes subnutridas, mientras que la administración de STZ provocó hipoinsulinemia y una marcada hiperglucemia. Los niveles de IGF-I y las IGFBPs no se alteraron en ninguno de los dos modelos.

En los modelos desde 14 días las únicas diferencias con los modelos desde 16 días fueron una elevación en los niveles de IGF-I en las gestantes diabéticas y un descenso en las IGFBPs en las gestantes subnutridas, en comparación con las controles.

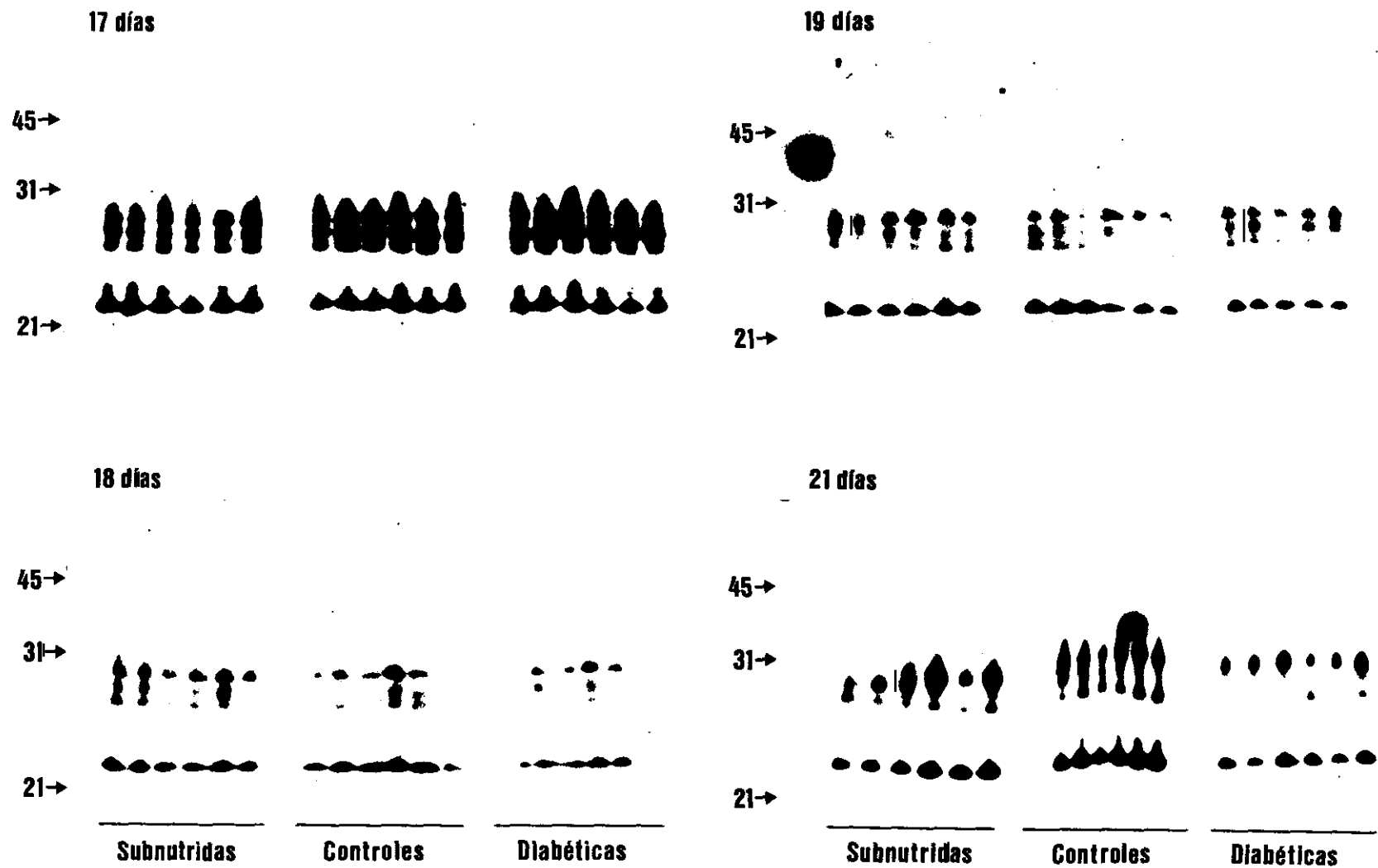
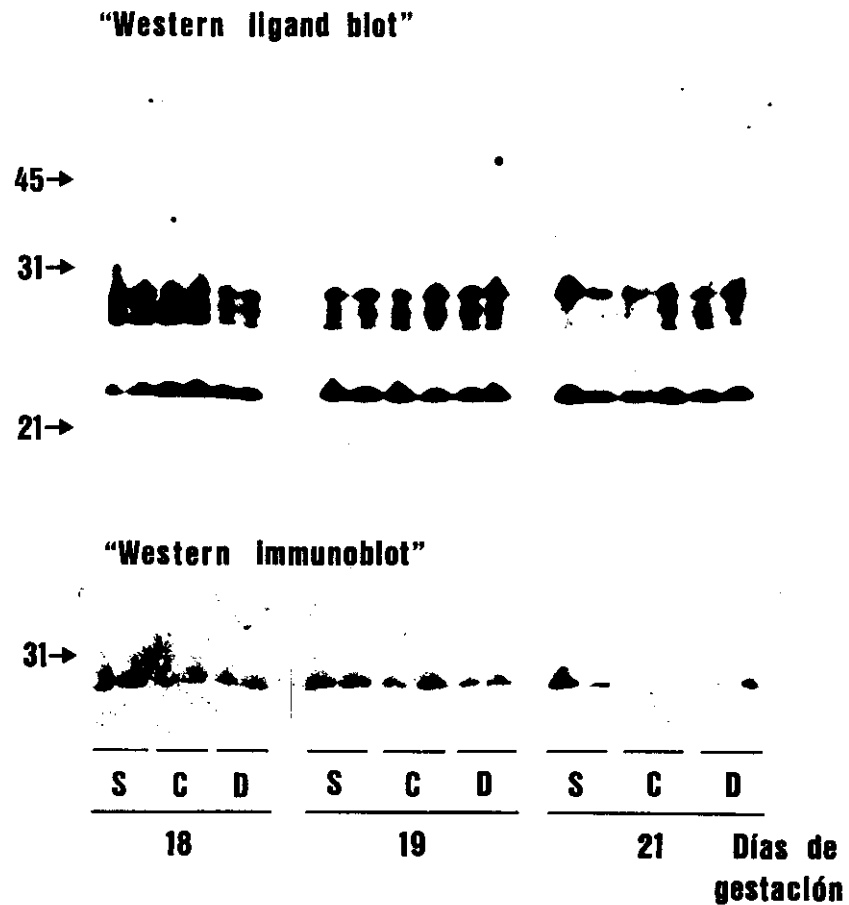


Figura 3.8. Análisis mediante "Western ligand blot" de las IGFBPs del suero de ratas gestantes subnutridas, diabéticas y sus controles alimentadas ad libitum, a lo largo del último tercio de la gestación. Inicio del tratamiento el día 16 de gestación, excepto a 17 días, en que el tratamiento se inició el día 14. La cantidad de suero analizada fue de 4  $\mu$ l. Las membranas fueron incubadas con  $2 \times 10^6$  cpm de  $^{125}$ I-IGF-II; el tiempo de exposición fue de 98 horas. A la izquierda, patrones de pesos moleculares (en kDa).



**Figura 3.9.** Análisis comparativo mediante "Western ligand blot" y "Western immunoblot" de las IGFBPs del suero de ratas gestantes subnutridas (S) desde el día 16 de gestación, diabéticas (D) (inicio del tratamiento el día 16 de gestación) y sus controles (C) alimentadas ad libitum. Se analizaron dos muestras de cada población a 18, 19 y 21 días de gestación. La cantidad de suero analizada fue de 4  $\mu$ l. Para el "ligand blot" las membranas fueron incubadas con  $2,5 \times 10^6$  cpm de  $^{125}$ I-IGF-II; el tiempo de exposición fue de 11 días. Para el "immunoblot" se empleó antisuero anti-bIGFBP-2. A la izquierda, patrones de pesos moleculares (en kDa).

**Tabla 3.3. IGFbps en suero de rata gestante. Cuantificación densitométrica de las autorradiografías de la figura 3.8. Los resultados de la cuantificación de los tres grupos de bandas se expresan como tanto por ciento de densidad óptica de cada banda con respecto a la densidad óptica total de la muestra correspondiente.**

Banda		Días de gestación			
		17	18	19	21
40-50 kDa	Subnutridas	2,71 ± 0,58 <sup>a</sup>	ND	ND	ND
	Controles	4,39 ± 3,72	ND	ND	ND
	Diabéticas	3,52 ± 1,20	ND	ND	ND
30 kDa	Subnutridas	52,12 ± 4,08 <sup>a</sup>	51,72 ± 5,08	49,25 ± 5,30	55,35 ± 7,03
	Controles	63,59 ± 3,58 <sup>b</sup>	51,77 ± 3,53	52,10 ± 7,94	53,59 ± 4,80
	Diabéticas	69,26 ± 2,80	59,81 ± 6,70	62,74 ± 4,88 <sup>a</sup>	55,84 ± 5,16
24 kDa	Subnutridas	45,17 ± 3,93 <sup>a</sup>	48,28 ± 5,08	50,75 ± 5,30	44,65 ± 7,03
	Controles	32,02 ± 2,83 <sup>b</sup>	48,23 ± 3,53	47,90 ± 7,94	46,41 ± 4,80
	Diabéticas	27,21 ± 3,58	40,18 ± 6,70	37,26 ± 4,88 <sup>a</sup>	44,16 ± 5,16

Media ± DE.

ND: no detectada.

<sup>a</sup> Significación estadística con respecto al grupo control.

<sup>b</sup> Significación estadística con respecto al grupo de edad inmediatamente superior.

### 3.2.6. Evolución del peso corporal fetal.

En la figura 3.10. se recoge la evolución del peso corporal de los fetos de ratas gestantes subnutridas, diabéticas y sus controles a lo largo del periodo estudiado. En las tres poblaciones de fetos se produjo un incremento progresivo del peso corporal de tipo exponencial, de modo que el día 21 el peso fue casi 8 veces superior al que presentaban los fetos a 17 días. No observamos diferencias estadísticamente significativas entre las tres poblaciones de fetos en ninguno de los estadios estudiados.

El número medio de fetos por camada (en torno a 12) fue similar en las tres poblaciones de ratas y en todos los estadios.

Se registró el peso de 3 poblaciones de ratas recién nacidas procedentes de madres subnutridas (desde el día 16 de gestación), diabéticas (inyectadas con STZ el día 16 de gestación) y controles (alimentadas *ad libitum*). El peso de los recién nacidos (media  $\pm$  DE de 2 camadas) de madre subnutrida ( $4,38 \pm 0,27$  g) fue significativamente inferior al de los controles ( $6,01 \pm 0,38$  g); no hubo diferencias significativas entre el peso de los recién nacidos de madre diabética ( $5,72 \pm 0,40$  g) y los controles.

### 3.2.7. Glucemia e insulinemia fetales.

La glucemia fetal (Tabla 3.2.), al igual que la de la rata gestante, se determinó en estado postabsortivo. En los fetos control este parámetro apenas experimentó variaciones a lo largo del periodo de estudio, manteniéndose por debajo de 50 mg/100 ml. No se observaron diferencias significativas con la glucemia de los fetos subnutridos, pero sí con la de los fetos de madre diabética, cuyos valores de glucemia fueron muy superiores (entre 6 y 9 veces) en todas las etapas.

Análogamente a lo que sucedía con el peso, se produjo un incremento progresivo de la insulinemia fetal (Tabla 3.2.), que fue significativo, tanto en ratas subnutridas como en sus controles, entre 18 y 19 y entre 19 y 21 días. La insulinemia de los fetos subnutridos fue similar a la de sus controles a todas las edades excepto a 21 días, en que los primeros presentaron niveles significativamente superiores a los de sus controles.

La insulinemia de los fetos diabéticos fue significativamente inferior a la de sus controles a 17 días (cuando la STZ se administró a los 14 días) y a 19 y 21 días (cuando se administró a los 16).

### **3.2.8. Niveles de IGF-II en suero fetal.**

Los niveles de IGF-II circulante (Fig. 3.11.) en los fetos procedentes de gestantes alimentadas *ad libitum* experimentaron un descenso, aunque irregular, a lo largo del periodo estudiado, alcanzando al final de la gestación un valor de aproximadamente la tercera parte del valor a 17 días.

En los fetos procedentes de madres subnutridas (Fig. 3.11.A) la concentración de IGF-II fue significativamente inferior (aproximadamente la mitad) a la de los fetos control a 18 y 19 días. A 21 días los niveles de esta hormona fueron similares en ambas poblaciones.

La concentración de IGF-II en el suero de los fetos procedentes de madres diabéticas (desde día 16) (Fig. 3.11.B) fue significativamente más alta que la de los fetos control a 18, 19 y 21 días (entre 1,4 veces a 19 días y 2,7 veces a 21 días). Por el contrario, cuando la STZ se administró el día 14 la concentración sérica de IGF-II de los fetos a 17 días fue de aproximadamente la mitad de la que presentaron los controles de la misma edad.

### **3.2.9. Niveles de IGF-I en suero fetal.**

Se efectuó la determinación de la concentración de IGF-I circulante en las mismas muestras en que se valoró IGF-II, obteniéndose un patrón de alteraciones paralelo al que resultó en la cuantificación de IGF-II. Debido a las altas concentraciones de IGF-II presentes en periodo fetal, y teniendo en cuenta el grado de reacción de cruce de este péptido en nuestro RIA de IGF-I, concluimos que los resultados obtenidos reflejan la interferencia de IGF-II en la cuantificación de IGF-I, por lo que no hemos considerado estos resultados en nuestro estudio.

### **3.2.10. Análisis de las IGFBPs en suero fetal.**

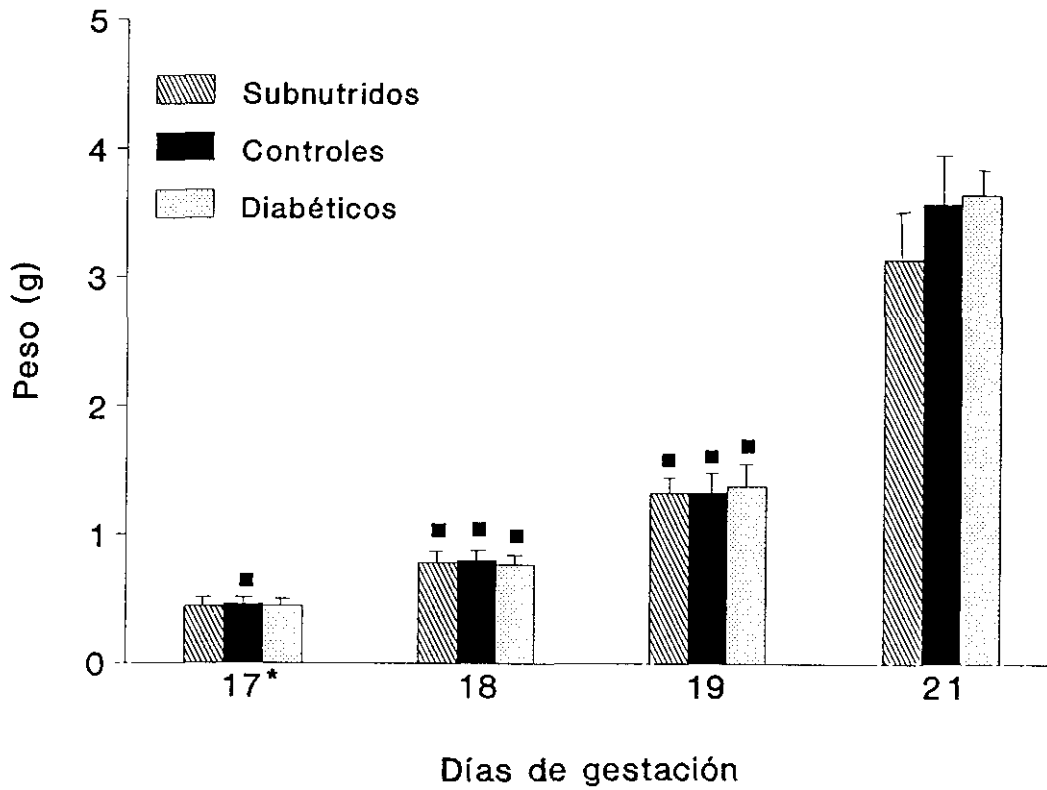
#### **3.2.10.1. IGFBPs en suero fetal normal. Análisis mediante "Western ligand blot".**

Previamente al análisis de las IGFBPs del suero de fetos procedentes de ratas gestantes sometidas a alteraciones de su estado hormonal o nutricional efectuamos un estudio mediante "Western ligand blot" de la evolución del patrón de IGFBPs en el suero de fetos normales de 17, 18, 19 y 21 días de gestación.

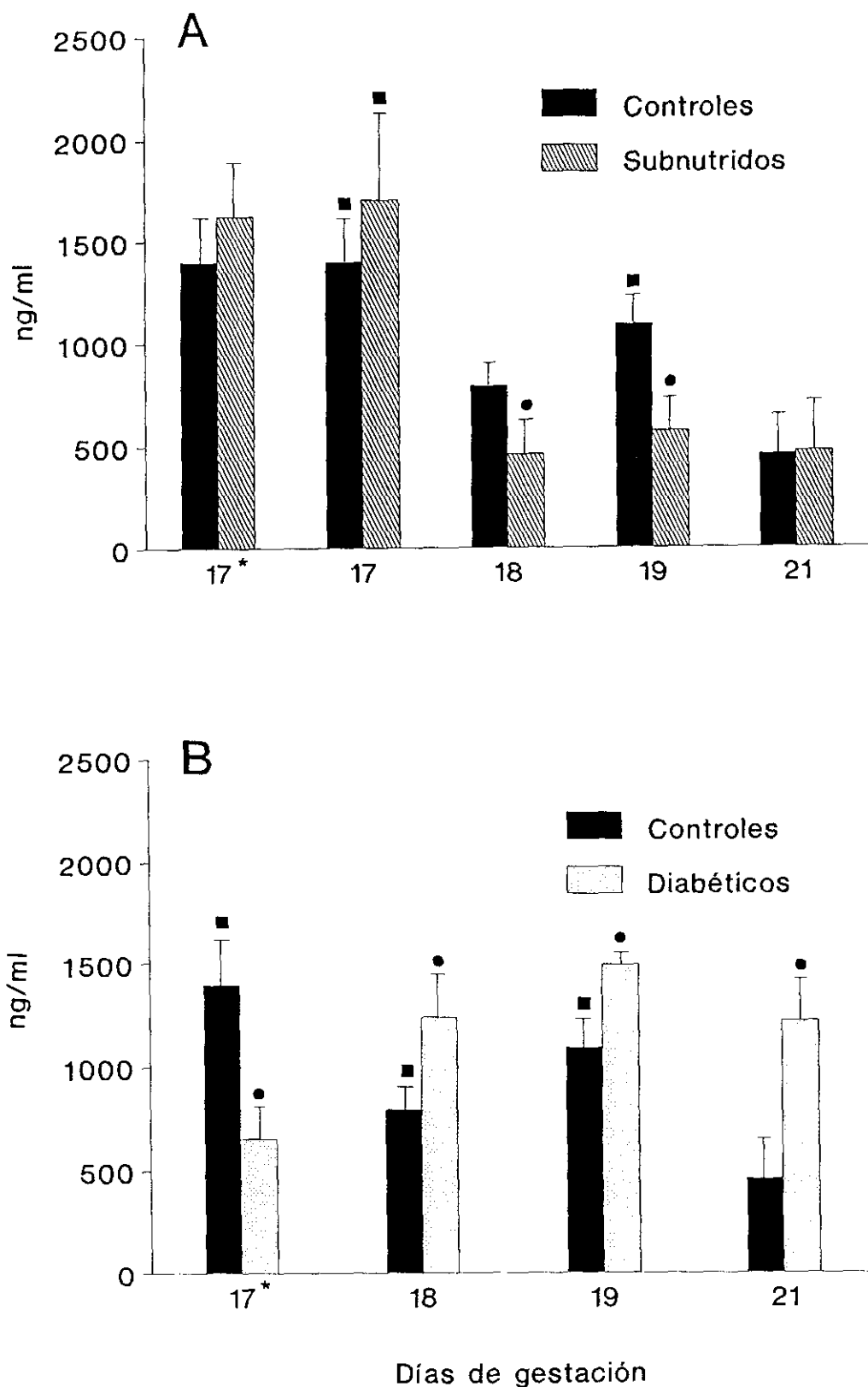
El patrón de bandas típico del suero de rata fetal (Fig. 3.12.) se caracteriza por la presencia de una banda muy intensa con un peso molecular aparente de aproximadamente 30 kDa que constituye la mayor parte de la IGFBP detectable mediante esta técnica. Se



### Evolución del peso corporal fetal



**Figura 3.10.** Evolución del peso corporal de fetos de ratas gestantes subnutridas, diabéticas y sus controles alimentadas ad libitum, al final de la gestación. Inicio del tratamiento el día 16 de gestación, excepto \*, en que se inició el día 14. Media  $\pm$  DE de 5 a 8 camadas. ■ Significación estadística con respecto al grupo de edad inmediatamente superior.



**Figura 3.11.** Niveles de IGF-II en suero de fetos de ratas gestantes subnutridas (A), diabéticas (B) y sus controles alimentadas ad libitum, al final de la gestación. Inicio del tratamiento el día 16 de gestación, excepto \*, en que se inició el día 14. Media  $\pm$  DE de 5 - 6 animales. ● Significación estadística con respecto al grupo control. ■ Significación estadística con respecto al grupo de edad inmediatamente superior.

aprecia claramente también una banda de menor intensidad a 24 kDa y finalmente dos bandas entre 40 y 50 kDa, claramente visibles a 17 días y muy tenues a las demás edades.

En la tabla 3.4. se recoge el resultado de la cuantificación densitométrica de las bandas de la autorradiografía de la figura 3.12., expresado tanto en valor absoluto (unidades arbitrarias) como en tanto por ciento de intensidad de cada banda con respecto a la intensidad total del suero correspondiente. La banda de 30 kDa, que supone un 80 a 90% de la IGFBP total del suero fetal, se mantiene constante entre 17 y 19 días, y sólo a 21 días experimenta un descenso (aproximadamente un 27%) significativo con respecto a las etapas anteriores. La importancia relativa de las bandas de 24 kDa, y sobre todo de 40-50 kDa, es menor. Salvo a 17 días, donde las bandas de 40-50 kDa suponen un 11,7% de la IGFBP total, a edades posteriores sólo representa entre un 3,4 y un 5,6%. Por lo que respecta a la banda de 24 kDa, se observó un aumento progresivo (y estadísticamente significativo) de intensidad relativa entre 17 y 21 días, pasando de un 5,1% a un 13,7%.

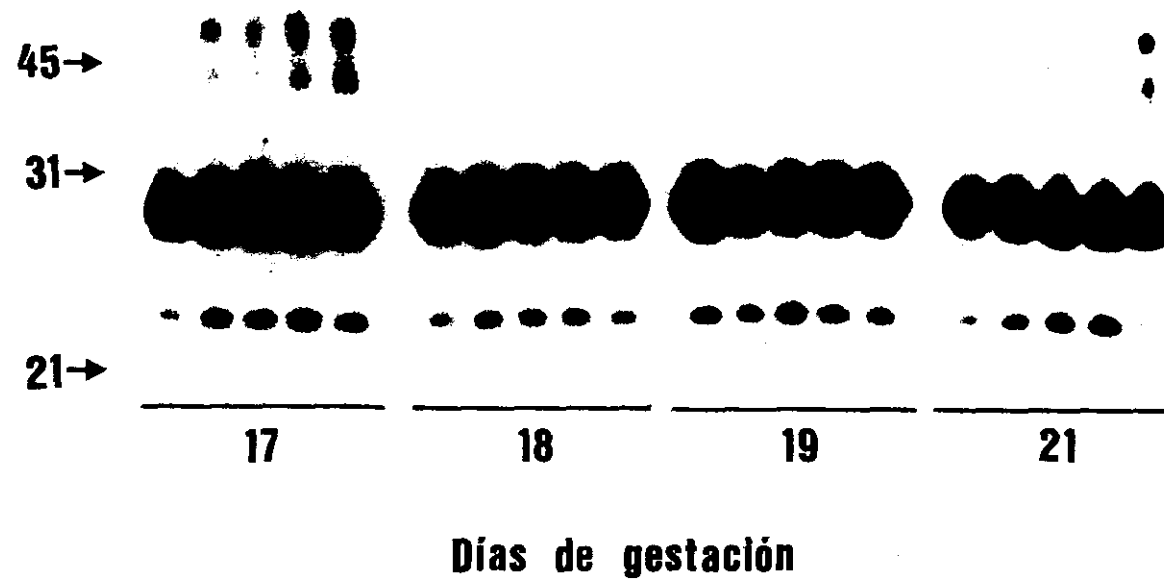
#### **3.2.10.2. IGFBPs en suero de fetos procedentes de ratas gestantes subnutridas y diabéticas. Análisis mediante "Western ligand blot".**

Las IGFBPs circulantes de los fetos procedentes de madres subnutridas, diabéticas y sus controles se analizaron mediante "Western ligand blot". Se incluyeron en el análisis muestras de fetos de 17 días (instauración de la subnutrición o administración de STZ el día 14) y de 18, 19 y 21 días (instauración de la subnutrición o administración de STZ el día 16), tal como se muestra en las autorradiografías de la figura 3.13. Se aprecia claramente en esta figura el patrón de bandas característico del suero de rata fetal, descrito en el epígrafe anterior. Las muestras de ratas subnutridas, diabéticas y controles de la misma edad se analizaron en un mismo gel, por lo que a efectos de hacer comparables los resultados entre distintas edades se corrió una misma muestra de suero de feto de 21 días en todos los geles.

#### **3.2.10.3. Análisis comparativo mediante "Western ligand blot" y "Western immunoblot".**

El resultado del estudio comparativo de las IGFBPs del suero mediante "Western ligand blot" y "Western immunoblot" se muestra en la figura 3.14. En el mismo gel se analizó el equivalente de 2,5  $\mu$ l de suero de dos muestras de cada población (fetos de gestantes subnutridas, controles y diabéticas), agrupadas por edades (18, 19 y 21 días). En la membrana de nitrocelulosa se efectuaron sucesivamente el análisis mediante "ligand blot" y el análisis mediante "immunoblot" con antisuero anti-bIGFBP-2.

En el análisis mediante "Western ligand blot" se observa el patrón de bandas característico de la rata fetal ya comentado en epígrafes anteriores. En el análisis mediante



**Figura 3.12.** Análisis mediante "Western ligand blot" de las IGF-BPs del suero de fetos de ratas gestantes controlas alimentadas ad libitum, al final de la gestación. La cantidad de suero analizada fue de 2,5  $\mu$ l. Las membranas fueron incubadas con  $0,5 \times 10^6$  cpm de  $^{125}$ I-IGF-II; el tiempo de exposición fue de 66 horas. A la izquierda, patrones de pesos moleculares (en kDa).

**Tabla 3.4.** IGFBPs en suero fetal normal. Cuantificación densitométrica de la autorradiografía de la figura 3.12. Los resultados de la cuantificación de los tres grupos de bandas se expresan en valor absoluto (unidades arbitrarias de densidad óptica) y como tanto por ciento de densidad óptica de cada banda con respecto a la densidad óptica total de la muestra correspondiente.

Banda		Días de gestación			
		17	18	19	21
40-50 kDa	Densidad óptica	561,0 ± 152,0 <sup>a,b</sup>	144,7 ± 45,0	250,4 ± 70,6	198,5 ± 123,7
	% del total	11,66 ± 1,32 <sup>a,b</sup>	3,44 ± 0,94	5,16 ± 1,52	5,58 ± 2,79
30 kDa	Densidad óptica	3970,2 ± 772,6 <sup>b</sup>	3773,8 ± 511,6	3754,5 ± 596,0 <sup>a</sup>	2743,8 ± 161,7
	% del total	83,27 ± 1,18 <sup>a</sup>	90,10 ± 1,60 <sup>a</sup>	84,89 ± 3,82	80,70 ± 5,36
24 kDa	Densidad óptica	243,0 ± 63,8	267,8 ± 40,9 <sup>a</sup>	472,0 ± 71,4	431,8 ± 171,3
	% del total	5,07 ± 0,72 <sup>b</sup>	6,46 ± 1,09 <sup>a</sup>	9,95 ± 2,77 <sup>a</sup>	13,73 ± 2,97
Densidad óptica total		4774,2 ± 962,2 <sup>b</sup>	4186,2 ± 539,2	4475,9 ± 639,7	3475,3 ± 424,1

Media ± DE.

<sup>a</sup> Significación estadística con respecto al grupo de edad inmediatamente superior.

<sup>b</sup> Significación estadística entre 17 y 21 días.

"Western immunoblot" se aprecia claramente en todas las muestras una banda de aproximadamente 30 kDa superponible a la banda del mismo peso molecular aparente del "Western ligand blot".

#### **3.2.10.4. Cuantificación densitométrica.**

En la figura 3.15. y en la tabla 3.5. se recogen los resultados de la cuantificación densitométrica de las autorradiografías de la figura 3.13., expresados, respectivamente, en valor absoluto (unidades arbitrarias) o en tanto por ciento de intensidad de cada banda con respecto a la intensidad total del suero correspondiente. La intensidad de la banda de 30 kDa, que es la más abundante, experimentó, en las ratas control, un ligero descenso a lo largo del periodo estudiado (significativo entre 17 y 21 días). Un descenso similar, aunque más regular, se observó en la banda de 24 kDa. En el grupo de bandas de 40-50 kDa se aprecia un brusco descenso entre 17 y 18 días; posteriormente no encontramos cambios significativos. El ligamiento total de IGF-II (IGFBP total) refleja los cambios en la banda de 30 kDa, que es con mucho la más intensa en todos los estadios. Estos resultados son similares a los ya descritos en 3.2.10.1., con la salvedad de que allí se encontró un ligero incremento de la intensidad de la banda de 24 kDa entre 17 y 21 días, a diferencia de lo observado en esta prueba.

No hemos encontrado diferencias significativas entre fetos de gestantes subnutridas o diabéticas y sus controles en ninguna de las formas de IGFBPs en ninguno de los estadios cuando el tratamiento se inició el día 16. Por el contrario, cuando el tratamiento se inició el día 14, sólo en los fetos de gestantes diabéticas se observó, el día 17, un descenso ligero (25% aproximadamente) pero significativo en la intensidad de los tres grupos de bandas y en la IGFBP total.

No se observaron tampoco diferencias significativas entre las tres poblaciones estudiadas, en ninguno de los tres grupos de bandas, cuando el resultado de la cuantificación de las autorradiografías se expresó como porcentaje de IGFBP total en el suero.

#### **3.2.11. Estudio del ligamiento de IGF-I y II a preparaciones de membrana plasmática.**

Se estudió el ligamiento de ambas hormonas, IGF-I e IGF-II, a preparaciones de membrana plasmática de cerebro e hígado de fetos de 19 y 21 días, tanto de gestantes subnutridas desde el día 16 de gestación como de gestantes que recibieron STZ el día 16 de gestación, en comparación con sus controles alimentadas *ad libitum*. También se estudió el ligamiento de IGF-II a preparaciones de placenta de las tres poblaciones y de los

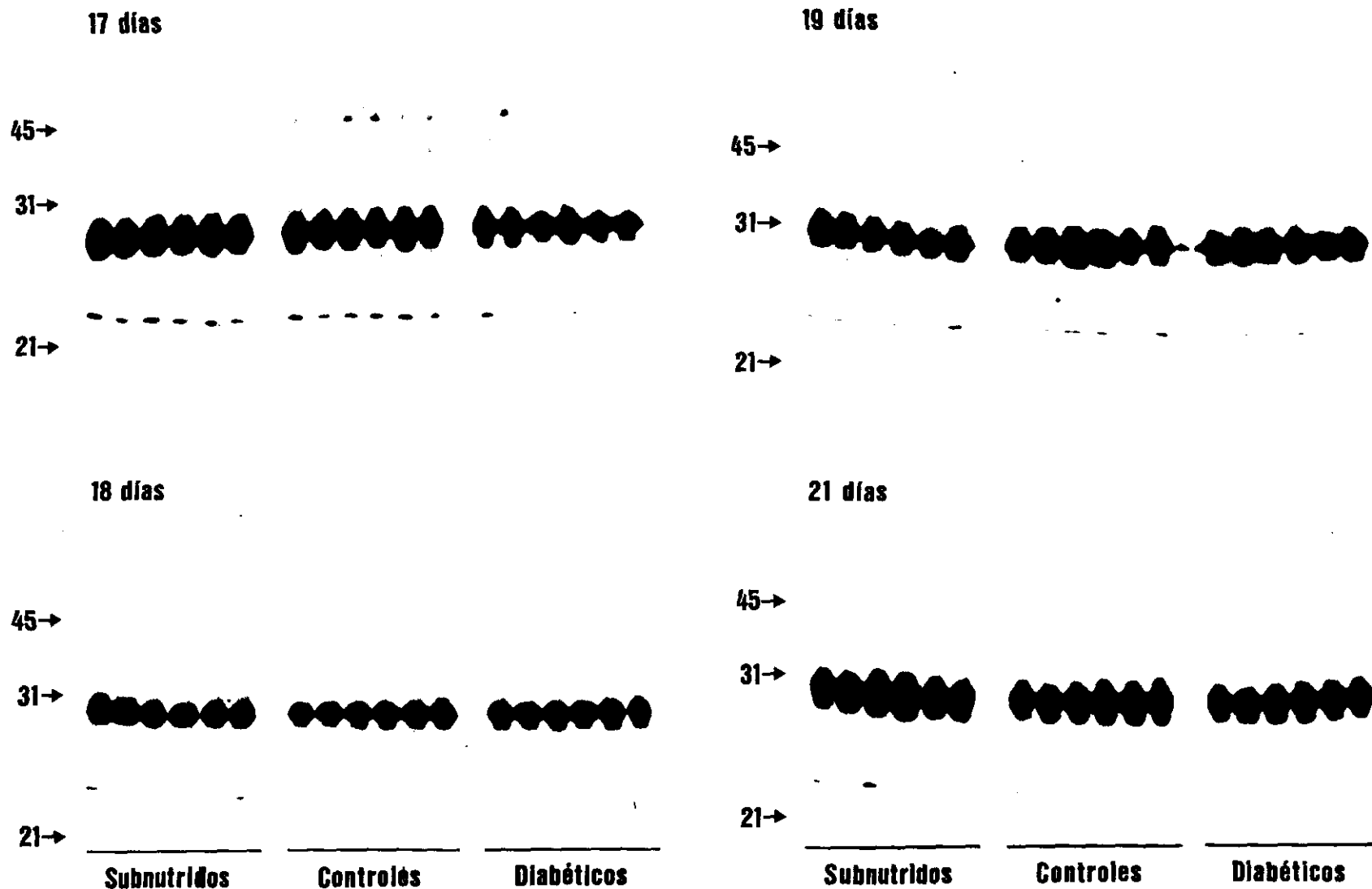
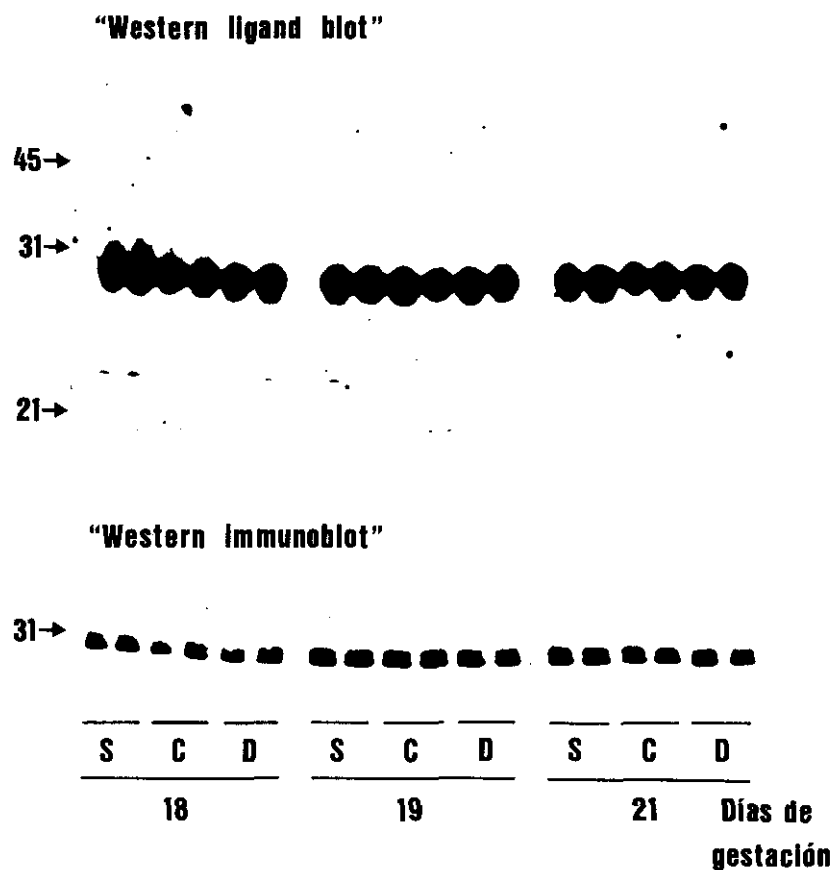


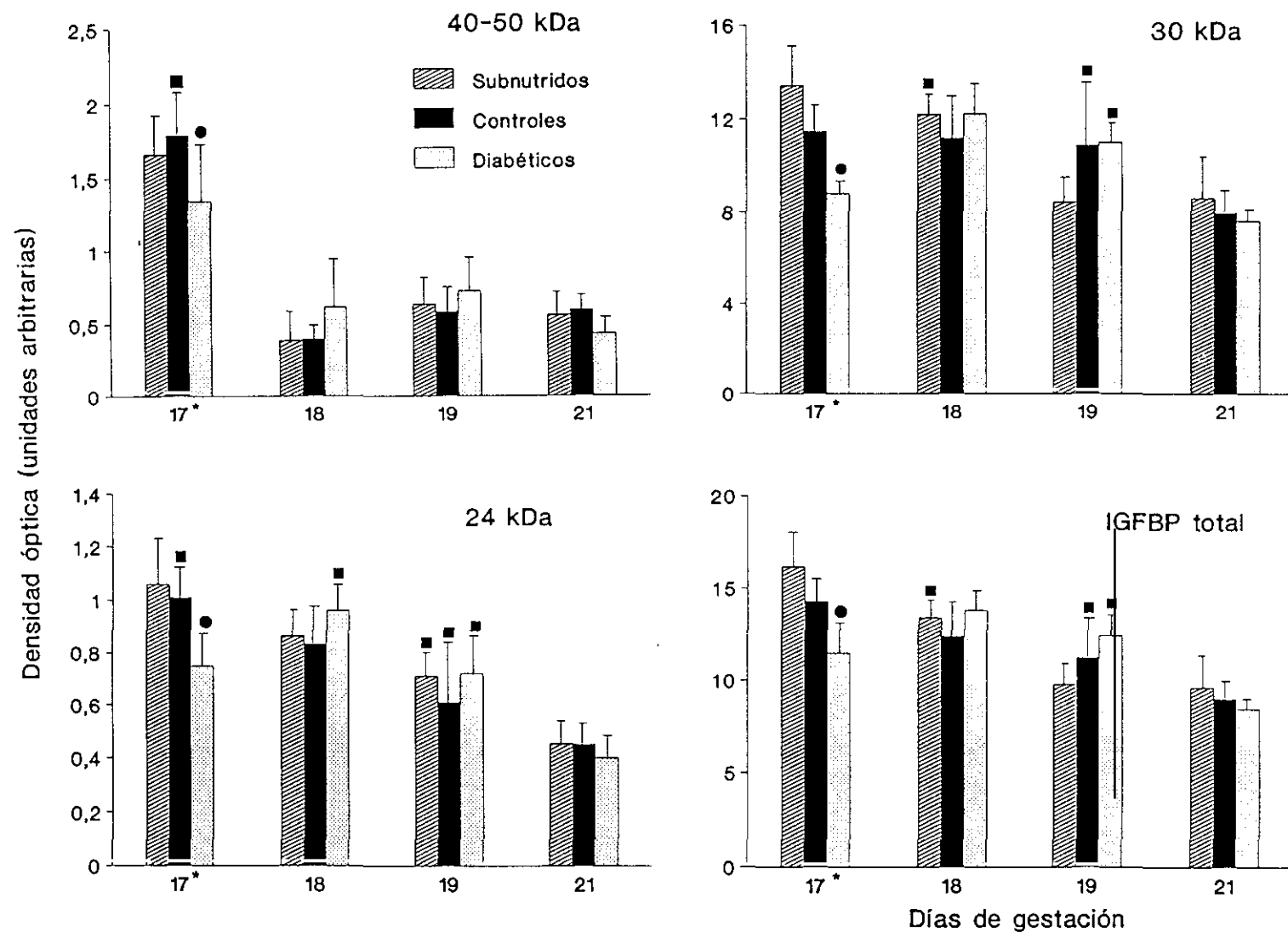
Figura 3.13. Análisis mediante "Western ligand blot" de las IGFBPs del suero de fetos de ratas gestantes subnutridas, diabéticas y sus controles alimentadas ad libitum, al final de la gestación. Inicio del tratamiento el día 16 de gestación, excepto 17 días, en que el tratamiento se inició el día 14. La cantidad de suero analizada fue de 2,5  $\mu$ l. Las membranas fueron incubadas con  $2 \times 10^6$  cpm de  $^{125}$ I-IGF-II; el tiempo de exposición fue de 66 horas. A la izquierda, patrones de pesos moleculares (en kDa).



**Figura 3.14.** *Análisis comparativo mediante "Western ligand blot" y "Western immunoblot" de las IGFbps del suero de fetos de ratas gestantes subnutridas (S) y diabéticas (D) (inicio del tratamiento el día 16 de gestación) y sus controles (C) alimentadas ad libitum. Se analizaron dos muestras de cada población a 18, 19 y 21 días de gestación. La cantidad de suero analizada fue de 2,5  $\mu$ l. Para el "ligand blot" las membranas fueron incubadas con  $2,5 \times 10^6$  cpm de  $^{125}$ I-IGF-II; el tiempo de exposición fue de 11 días. Para el "immunoblot" se empleó antisuero anti-bGFBP-2. A la izquierda, patrones de pesos moleculares (en kDa).*



**Figura 3.15.** IGFBPs en suero fetal. Cuantificación densitométrica de las autorradiografías de la figura 3.13. El resultado se expresa como unidades arbitrarias. Inicio del tratamiento el día 16 de gestación, excepto \*, en que se inició el día 14. Media  $\pm$  DE de 6 animales. ● Significación estadística con respecto al grupo control. ■ Significación estadística con respecto al grupo de edad inmediatamente superior.



**Tabla 3.5.** *IGFBPs en suero fetal. Cuantificación densitométrica de las autorradiografías de la figura 3.13. Los resultados de la cuantificación de los tres grupos de bandas se expresan como tanto por ciento de densidad óptica de cada banda con respecto a la densidad óptica total de la muestra correspondiente.*

Banda		Días de gestación			
		17	18	19	21
40-50 kDa	Subnutridos	10,33 ± 1,39	2,86 ± 1,31	6,50 ± 1,34	6,09 ± 2,22
	Controles	12,58 ± 2,03 <sup>a</sup>	3,25 ± 0,98	5,02 ± 1,82	6,63 ± 0,56
	Diabéticos	11,99 ± 3,65	4,53 ± 2,47	5,79 ± 1,49	5,15 ± 1,02
30 kDa	Subnutridos	83,16 ± 1,53	91,00 ± 1,26	86,21 ± 1,14	89,10 ± 2,88
	Controles	80,37 ± 2,11 <sup>a</sup>	90,05 ± 1,29	89,78 ± 4,02	88,24 ± 1,25
	Diabéticos	81,90 ± 4,24	88,49 ± 2,92	88,46 ± 1,96	90,09 ± 0,89
24 kDa	Subnutridos	6,51 ± 0,43	6,46 ± 0,65	7,29 ± 0,70	4,81 ± 0,92
	Controles	7,05 ± 0,65	6,69 ± 0,64	5,20 ± 2,37	5,13 ± 1,44
	Diabéticos	6,10 ± 1,20	6,97 ± 0,74	5,75 ± 0,74	4,76 ± 1,18

Media ± DE.

<sup>a</sup> Significación estadística con respecto al grupo de edad inmediatamente superior.

mismos estadios. El resultado se expresa como el porcentaje de ligamiento específico con respecto al ligamiento total, y se presenta en la tabla 3.6.

#### **3.2.11.1. Hígado.**

Tal como muestra la tabla 3.6., el porcentaje de unión específica de IGF-I a hígado fue muy bajo, entre 1 y 1,5%. No se observaron cambios significativos entre las tres poblaciones de fetos (subnutridos, diabéticos y controles) en ninguno de los estadios estudiados. Tampoco hubo diferencia significativa alguna en el ligamiento entre 19 y 21 días en ninguna de las dos poblaciones con respecto a los controles.

A diferencia de lo que sucede con IGF-I, el ligamiento específico de IGF-II a membranas de hígado fue apreciable (entre 13 y 20%). Tampoco aquí se obtuvieron diferencias significativas entre fetos subnutridos o diabéticos y sus controles. Aunque en las tres poblaciones se produjo un ligero incremento en el porcentaje de ligamiento específico de IGF-II entre 19 y 21 días, este incremento fue significativo sólo en el grupo de fetos diabéticos.

Se determinó la constante de afinidad del ligamiento de IGF-II en dos muestras de preparaciones de membranas de 19 días de cada una de las tres poblaciones estudiadas, mediante análisis de Scatchard. Los trazados resultantes se ajustaban a rectas, y los valores de  $K_a$  obtenidos (a multiplicar por  $10^9 \text{ M}^{-1}$ ) fueron  $1,18 \pm 0,22$  para los fetos controles,  $1,50 \pm 0,13$  para los subnutridos y  $0,74 \pm 0,05$  para los diabéticos. El análisis estadístico no mostró diferencias significativas entre estos valores.

#### **3.2.11.2. Cerebro.**

El porcentaje de unión específica de IGF-I a membranas de cerebro fue muy bajo (entre 1,6 y 2,6%) y no mostró diferencias significativas entre fetos subnutridos o diabéticos y sus controles. Aunque se observó un ligero descenso en el porcentaje de ligamiento entre 19 y 21 días en las tres poblaciones, no hubo significación estadística.

Por lo que respecta al ligamiento específico de IGF-II, no se observaron cambios significativos ni con la edad ni con el tratamiento, manteniéndose entre el 7 y el 8% aproximadamente en todos los casos.

#### **3.2.11.3. Placenta.**

Como se muestra en la tabla 3.6., no encontramos cambios significativos ni con la edad ni con el tratamiento en el ligamiento específico de IGF-II a las preparaciones de placenta. El porcentaje de unión específica osciló en todos los casos entre el 10 y el 12%.

**Tabla 3.6.** *Ligamiento específico de IGF-I y II a preparaciones de membrana plasmática de placenta y de hígado y cerebro de fetos procedentes de ratas gestantes de 19 y 21 días subnutridas (desde el día 16 de gestación), diabéticas (inyectadas con STZ el día 16 de gestación) y controles alimentadas ad libitum.*

Días de gestación		IGF-I		IGF-II		
		Hígado	Cerebro	Hígado	Cerebro	Placenta
19	Subnutridos	1,29 ± 0,51	2,56 ± 0,56 <sup>a</sup>	13,63 ± 0,70	7,79 ± 1,92	10,40 ± 0,35
	Controles	1,03 ± 0,29	2,36 ± 0,32	12,55 ± 1,61	8,19 ± 1,26	11,83 ± 0,97
	Diabéticos	1,46 ± 0,79	2,31 ± 0,28	13,54 ± 0,59 <sup>a</sup>	7,14 ± 0,81	10,62 ± 0,92
21	Subnutridos	1,14 ± 0,03	1,64 ± 0,28	18,64 ± 2,28	6,90 ± 0,38	11,60 ± 1,96
	Controles	1,28 ± 0,31	1,64 ± 0,12	16,58 ± 4,62	7,22 ± 0,71	11,74 ± 1,67
	Diabéticos	1,33 ± 0,21	1,87 ± 0,20	19,72 ± 1,81	7,48 ± 1,02	11,60 ± 1,82

Media ± DE de 3 muestras analizadas por cuadruplicado.

<sup>a</sup> Significación estadística con respecto al grupo de edad inmediatamente superior.

### **3.2.12. Resumen de los resultados obtenidos en fetos.**

En ninguno de los dos modelos estudiados (desde 16 días) se han observado alteraciones del peso corporal en etapa fetal (sólo al nacimiento se evidenció un menor peso en los recién nacidos de gestantes subnutridas). La insulinemia y la glucemia no se alteraron tampoco en el modelo de subnutrición, mientras que en el de diabetes se observó una marcada hiperglucemia, acompañada en casi todos los estadios de hipoinsulinemia. Los niveles de IGF-II estaban reducidos a 18 y 19 días en los fetos de gestantes subnutridas y aumentados entre 18 y 21 días en los fetos de gestantes diabéticas. No se encontraron diferencias entre los tres modelos en las IGFBPs, la más abundante de las cuales fue una forma de 30 kDa (en su mayor parte IGFBP-2).

En los modelos desde 14 días la diferencia más destacada se observó en los fetos de gestante diabética, que presentaron niveles de IGF-II y de IGFBPs disminuidos con respecto a los fetos control.

### **3.3. Subnutrición y diabetes en periodo neonatal**

Un estudio análogo al efectuado en etapa fetal se llevó a cabo en la rata en periodo neonatal. En los animales subnutridos la restricción dietética comenzó el día 16 de gestación y se prolongó durante la lactancia; esta restricción fue indirecta, ya que derivó de la carencia nutricional materna. El modelo de diabetes por STZ se provocó por inyección intraperitoneal de esta sustancia a las crías el día 4 de vida postnatal. Los animales fueron sacrificados a los 8, 14 y 22 días de edad.

#### **3.3.1. Evolución del peso corporal.**

Tanto las ratas subnutridas como las diabéticas presentaron un peso corporal inferior al de sus controles en los tres estadios estudiados (Fig. 3.16.). En las ratas subnutridas el peso alcanzado varió entre un 43% a 8 días y un 59% a 22 días con respecto a las ratas control, procedentes de madres alimentadas *ad libitum*; en las tres etapas las diferencias fueron estadísticamente significativas. En las ratas diabéticas la diferencia de peso no fue tan marcada: un 31 y un 19% inferior (en comparación con las controles) a 14 y 22 días, respectivamente, estadios en que hubo diferencias significativas.

Finalmente, como se aprecia en la figura 3.16., en las tres poblaciones se observó un progresivo incremento del peso corporal con la edad a lo largo de la etapa estudiada.

### **3.3.2. Glucemia e insulinemia.**

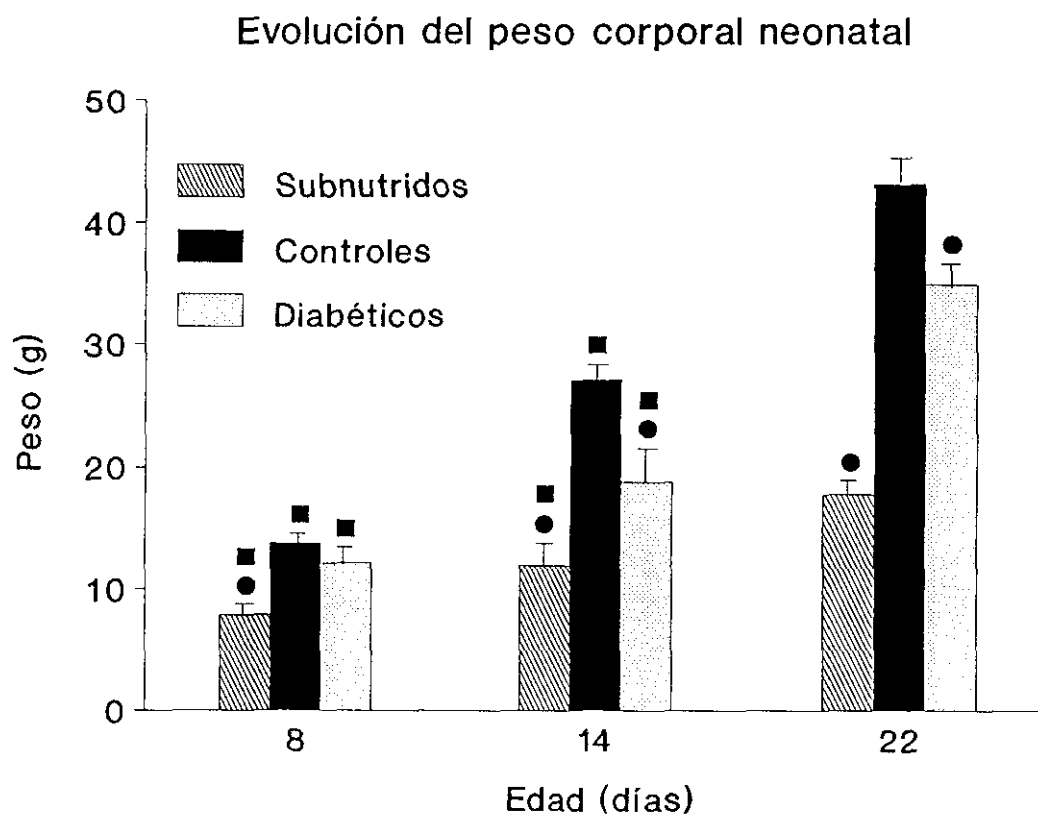
Los resultados de la determinación de la glucemia y la insulinemia de las ratas en periodo neonatal se recogen en la tabla 3.7. La glucemia de las ratas control se mantuvo constante en torno a 121 mg/100 ml en las tres etapas estudiadas. Las ratas subnutridas presentaron, a todas las edades, niveles de glucosa en sangre significativamente inferiores (entre un 20 y un 30% aproximadamente) a los de sus controles; por el contrario, la glucemia de las ratas diabéticas fue de 2,6 a 3,6 veces más elevada.

Por lo que se refiere a la insulinemia, se observó en los animales control un progresivo incremento en la concentración de esta hormona a lo largo del periodo estudiado, pasando de 1,68 ng/ml a 8 días a 3,85 ng/ml a 22 días. Tanto los animales subnutridos como los diabéticos presentaron niveles de insulina en suero inferiores a los de sus controles, con significación estadística en todos los casos (salvo en ratas diabéticas de 8 días). Estas diferencias con respecto a los animales control fueron más marcadas en las poblaciones de ratas subnutridas a 8 y 14 días y en las diabéticas a 22 días. En las ratas diabéticas se produjo además una disrupción del patrón de incremento de los niveles de insulina con la edad que presentaron los animales controles y subnutridos.

### **3.3.3. Niveles de IGF-I y II en suero.**

Los niveles de IGF-I (Fig. 3.17.A) en suero de ratas control experimentaron un progresivo incremento entre los 8 y los 22 días de vida, pasando de 135,1 a 278,0 ng/ml. De manera análoga a lo ya descrito para la insulina, tanto los animales subnutridos como los diabéticos presentaron niveles de IGF-I en suero significativamente inferiores a los de sus controles a todas las edades. En las ratas subnutridas los niveles de este péptido fueron entre un 69% (a 14 días) y un 91% (a 8 días) más bajos que los de sus controles. En las ratas diabéticas las diferencias fueron menos marcadas, con niveles entre un 39% (a 14 días) y un 57% (a 22 días) más bajos que en las ratas control. También en los animales diabéticos se produjo un trastorno del patrón de cambios de los niveles de IGF-I con la edad que se observó en los animales controles y en los subnutridos.

En la figura 3.17.B se representan las concentraciones de IGF-II en el suero de las tres poblaciones de ratas en etapa neonatal. Se aprecia en todas ellas un descenso progresivo de la concentración de este péptido conforme se incrementa la edad. Mientras que entre los animales subnutridos y sus controles no hemos hallado diferencia significativa alguna en ningún estadio, en los diabéticos de 8 y 14 días los niveles de IGF-II fueron significativamente más bajos (entre 50 y 60% aproximadamente) que los de sus controles.



**Figura 3.16.** Evolución del peso corporal de las ratas subnutridas (desde el día 16 de gestación), diabéticas (inyección de STZ el día 4) y controles (alimentadas ad libitum) en periodo neonatal. Media  $\pm$  DE de 6 - 8 animales. ● Significación estadística con respecto al grupo control. ■ Significación estadística con respecto al grupo de edad inmediatamente superior.

**Tabla 3.7.** Glucemia e insulinemia de ratas subnutridas (desde el día 16 de gestación), diabéticas (inyección de STZ el día 4) y sus controles alimentados ad libitum, en periodo neonatal.

Edad (días)		Glucemia	Insulinemia
8	Subnutridos	83,3 ± 9,8 <sup>a</sup>	0,92 ± 0,05 <sup>a</sup>
	Controles	121,1 ± 5,6	1,68 ± 0,21
	Diabéticos	356,8 ± 48,1 <sup>a</sup>	1,32 ± 0,42
14	Subnutridos	94,9 ± 11,4 <sup>a</sup>	0,83 ± 0,12 <sup>a,b</sup>
	Controles	121,2 ± 5,8	1,94 ± 0,23 <sup>b</sup>
	Diabéticos	312,3 ± 37,0 <sup>a</sup>	1,27 ± 0,13 <sup>a</sup>
22	Subnutridos	89,2 ± 10,1 <sup>a</sup>	2,80 ± 0,28 <sup>a</sup>
	Controles	121,3 ± 3,4	3,85 ± 0,46
	Diabéticos	439,3 ± 33,2 <sup>a</sup>	1,31 ± 0,30 <sup>a</sup>

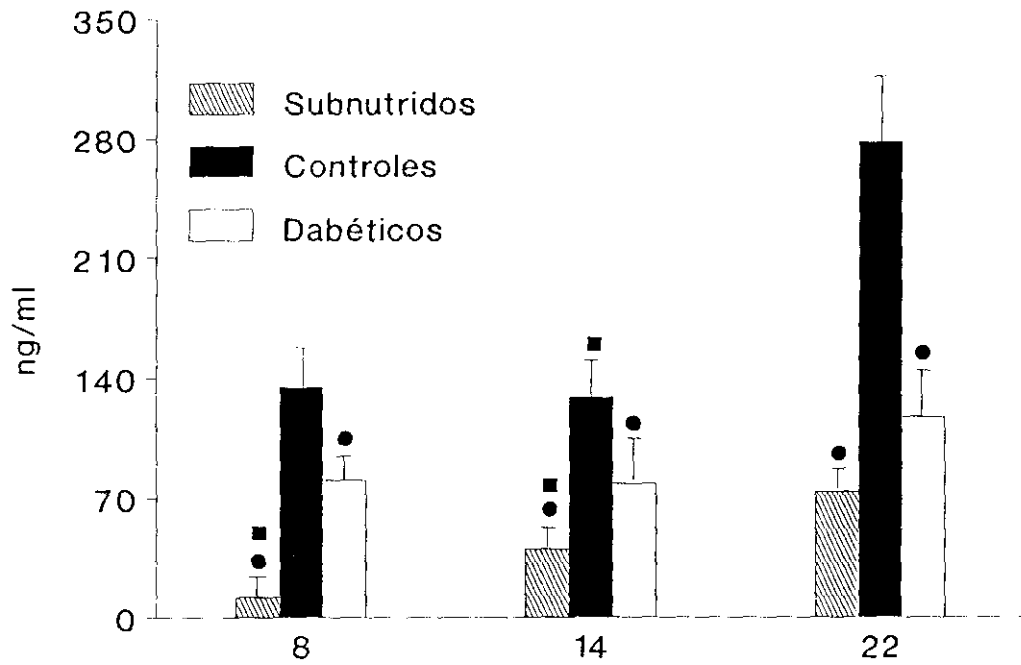
Media ± DE de 6 a 8 animales.

<sup>a</sup> Significación estadística con respecto al grupo control.

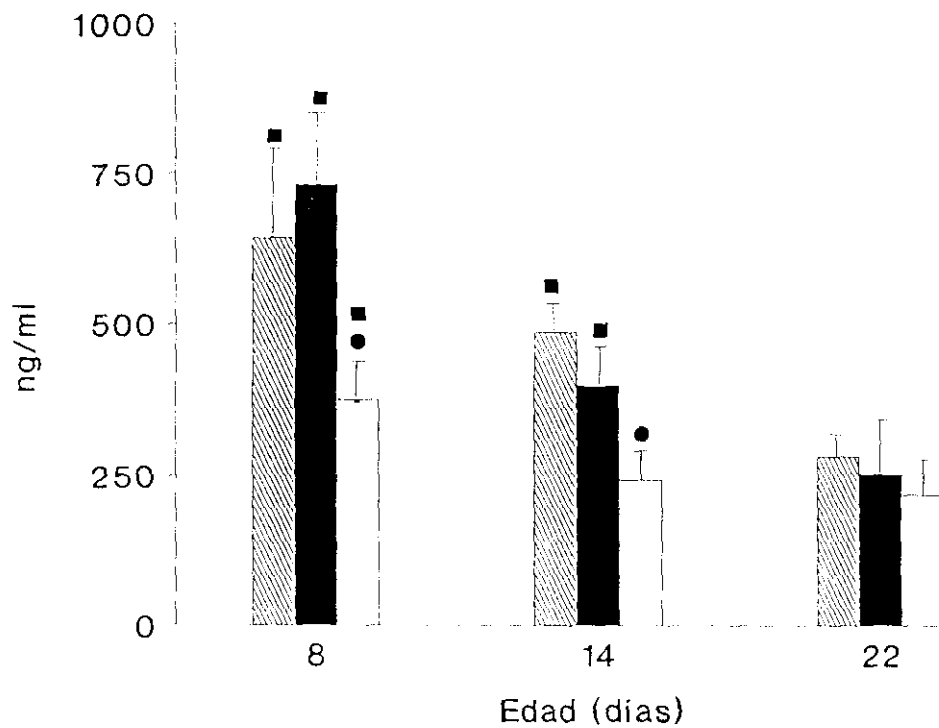
<sup>b</sup> Significación estadística con respecto al grupo de edad inmediatamente superior.



### A. IGF-I



### B. IGF-II



**Figura 3.17.** Niveles de IGF-I (A) e IGF-II (B) en suero de ratas subnutridas, diabéticas y sus controles alimentadas ad libitum en periodo neonatal. Media  $\pm$  DE de 5 - 6 animales. ● Significación estadística con respecto al grupo control. ■ Significación estadística con respecto al grupo de edad inmediatamente superior.

### **3.3.4. IGFBPs en suero neonatal.**

#### **3.3.4.1. "Western ligand blot".**

Las IGFBPs circulantes de los neonatos subnutridos, diabéticos y sus controles se analizaron mediante "Western ligand blot" (Fig. 3.18). Las muestras de las tres poblaciones de ratas de la misma edad se analizaron en un mismo gel, por lo que a efectos de hacer comparables los resultados entre distintas edades se corrió una misma muestra de suero patrón en todos los geles.

A todas las edades se observa claramente un patrón constituido por tres grupos de bandas, de pesos moleculares aparentes de 40-50 kDa, 30 kDa y 24 kDa. En las ratas control la banda de 30 kDa fue la más abundante a 8 y 14 días; a 22 días su intensidad disminuyó, y fue similar a la de las formas de 40-50 kDa. A todas las edades, tanto en las ratas subnutridas como en las diabéticas, la intensidad de esta banda de 30 kDa fue superior, en cuantía variable según la edad y el tratamiento, a la de las controles. A 40-50 kDa se aprecian 2 bandas cuya intensidad aumenta con la edad en las tres poblaciones; en las ratas subnutridas estas bandas son menos marcadas que en las controles a todas las edades. Por último, se observa también una banda nítida a 24 kDa cuya intensidad es menor a 22 días que a edades anteriores en las tres poblaciones.

#### **3.3.4.2. Análisis comparativo mediante "Western ligand blot" y "Western immunoblot".**

El resultado del estudio comparativo de las IGFBPs del suero mediante "Western ligand blot" y "Western immunoblot" se muestra en la figura 3.19. En el mismo gel se analizó el equivalente de 2,5  $\mu$ l de suero de dos muestras de cada población, agrupadas por edades (8, 14 y 22 días). Los análisis mediante "ligand blot" y mediante "immunoblot" con antisuero anti-bIGFBP-2 se efectuaron sucesivamente en la misma membrana de nitrocelulosa.

En el análisis mediante "Western ligand blot" se observa el patrón de bandas ya comentado en el epígrafe anterior. A 22 días se observan, en controles y diabéticas de 22 días, dos bandas en lugar de una en torno a 30 kDa, con pesos moleculares aparentes de 30 y 28 kDa; estas dos bandas se habrían detectado separadas probablemente también en las muestras de ratas subnutridas con un menor tiempo de exposición de la película. El análisis mediante "Western immunoblot" muestra claramente en todas las muestras una banda de aproximadamente 30 kDa que corresponde, al menos en parte, a la banda del mismo peso molecular aparente del "ligand blot". Si bien el incremento en la intensidad de esta banda que se observa en el "ligand blot" de las poblaciones de ratas subnutridas se debe, al menos en parte a la presencia en suero de mayores cantidades de IGFBP-2, no

es este el caso de los animales diabéticos, donde la cantidad de IGFBP-2 detectada por "immunoblot" es ligeramente menor a todas las edades, especialmente a 22 días. El incremento en la intensidad en torno a 30 kDa que se observa en el "ligand blot" de las ratas diabéticas se debe por tanto a una forma distinta de IGFBP-2, probablemente la banda de 28 kDa, que quizá corresponda a IGFBP-1.

#### **3.3.4.3. Cuantificación densitométrica.**

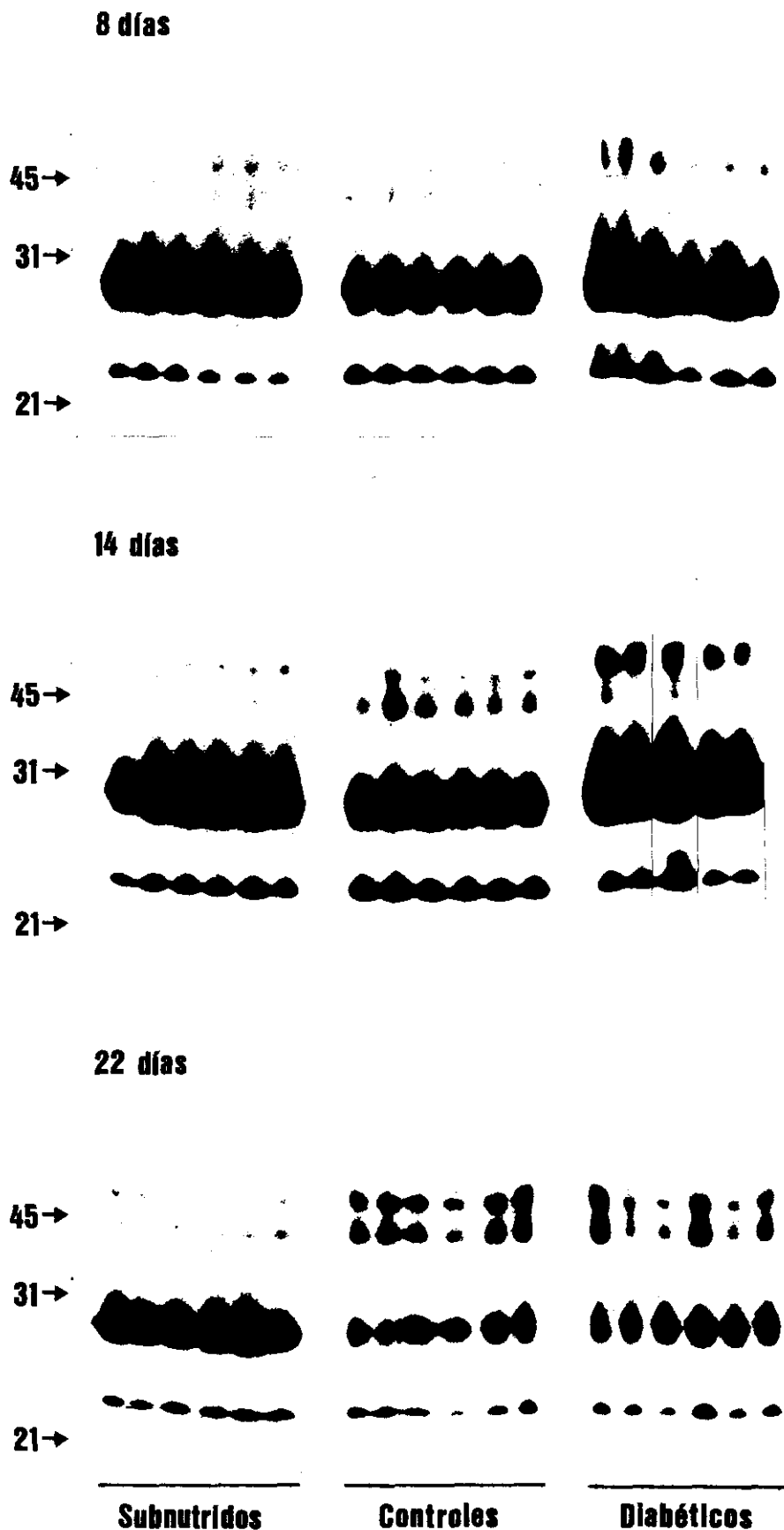
En la figura 3.20. y en la tabla 3.8. se recogen los resultados de la cuantificación densitométrica de las autorradiografías de la figura 3.18., expresados, respectivamente, en valor absoluto (unidades arbitrarias) o en tanto por ciento de intensidad de cada banda o grupo de bandas con respecto a la intensidad total del suero correspondiente.

En las ratas control la banda de 30 kDa fue la más abundante a 8 y 14 días, y su cuantía descendió a lo largo del periodo neonatal, pasando de un 77,4% de la IGFBP total cuantificable por este método a 8 días a un 42,2% a 14 días. Este descenso fue concomitante con el incremento de la intensidad de las bandas de 40-50 kDa, que pasaron de constituir un 2,5% de la IGFBP total a 8 días a un 44,0% a 22 días. La banda de 24 kDa experimentó cambios menos marcados en periodo neonatal, con un ligero descenso a 22 días, en que constituyó un 13,8% de la IGFBP total del suero.

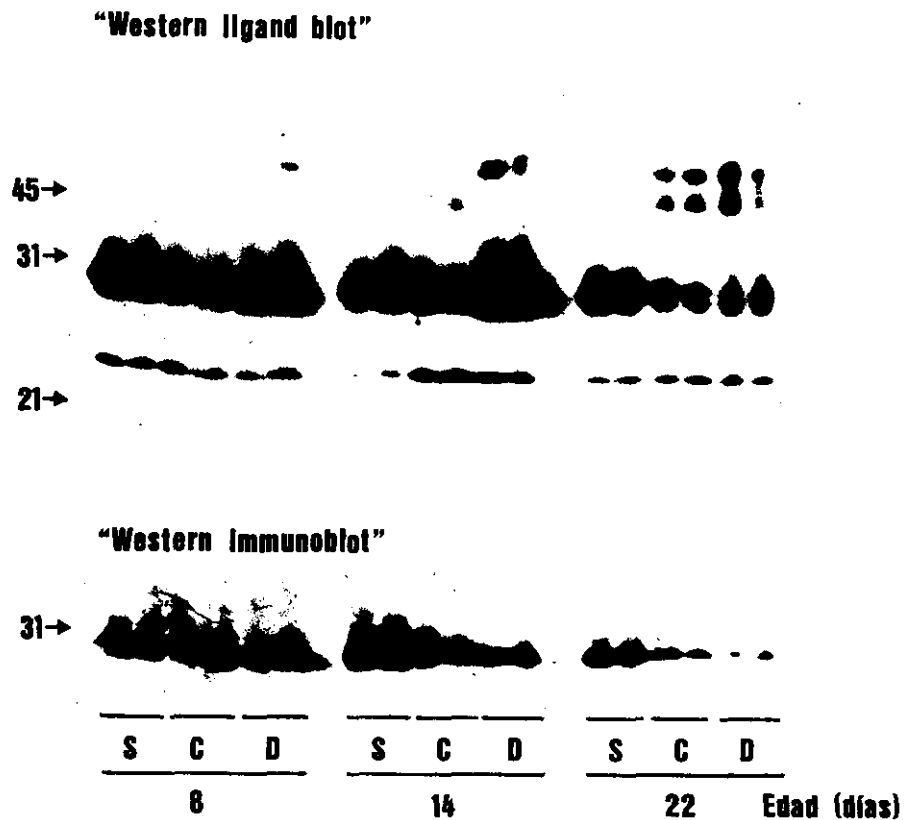
Tanto la subnutrición como la diabetes alteraron este patrón de bandas. En ambas se produjo un incremento de la intensidad de la banda de 30 kDa a todas las edades con respecto a las ratas control, de cuantía similar a 8 días (44,4%) pero más marcado en las diabéticas a 14 días (57,6% frente a 33,0% en subnutridas) y en las subnutridas a 22 días (60,7% frente a 43,9% en las diabéticas). La intensidad de las bandas de 40-50 kDa fue inferior (60% aproximadamente) en las ratas subnutridas a 14 y 22 días; en las diabéticas estas bandas presentaron una intensidad igual (a 22 días) o superior (a 8 y 14 días) a la de las controles. Por último, en la banda de 24 kDa no se observaron cambios significativos en las ratas diabéticas con respecto a las controles en ningún estadio, y sí en las subnutridas a 8 y 14 días, en las que la intensidad de esta banda fue un 39% menor. La IGFBP total refleja esencialmente los cambios en la intensidad de la banda de 30 kDa, que es la más abundante.

#### **3.3.5. Estudio del ligamiento de IGF-I y II a preparaciones de membrana plasmática.**

Se estudió el ligamiento de ambas hormonas, IGF-I e IGF-II, a preparaciones de membrana plasmática de cerebro e hígado de neonatos subnutridos, diabéticos y control de 8, 14 y 22 días. El resultado se expresa como el porcentaje de ligamiento específico con respecto al ligamiento total, y se presenta en la tabla 3.9.

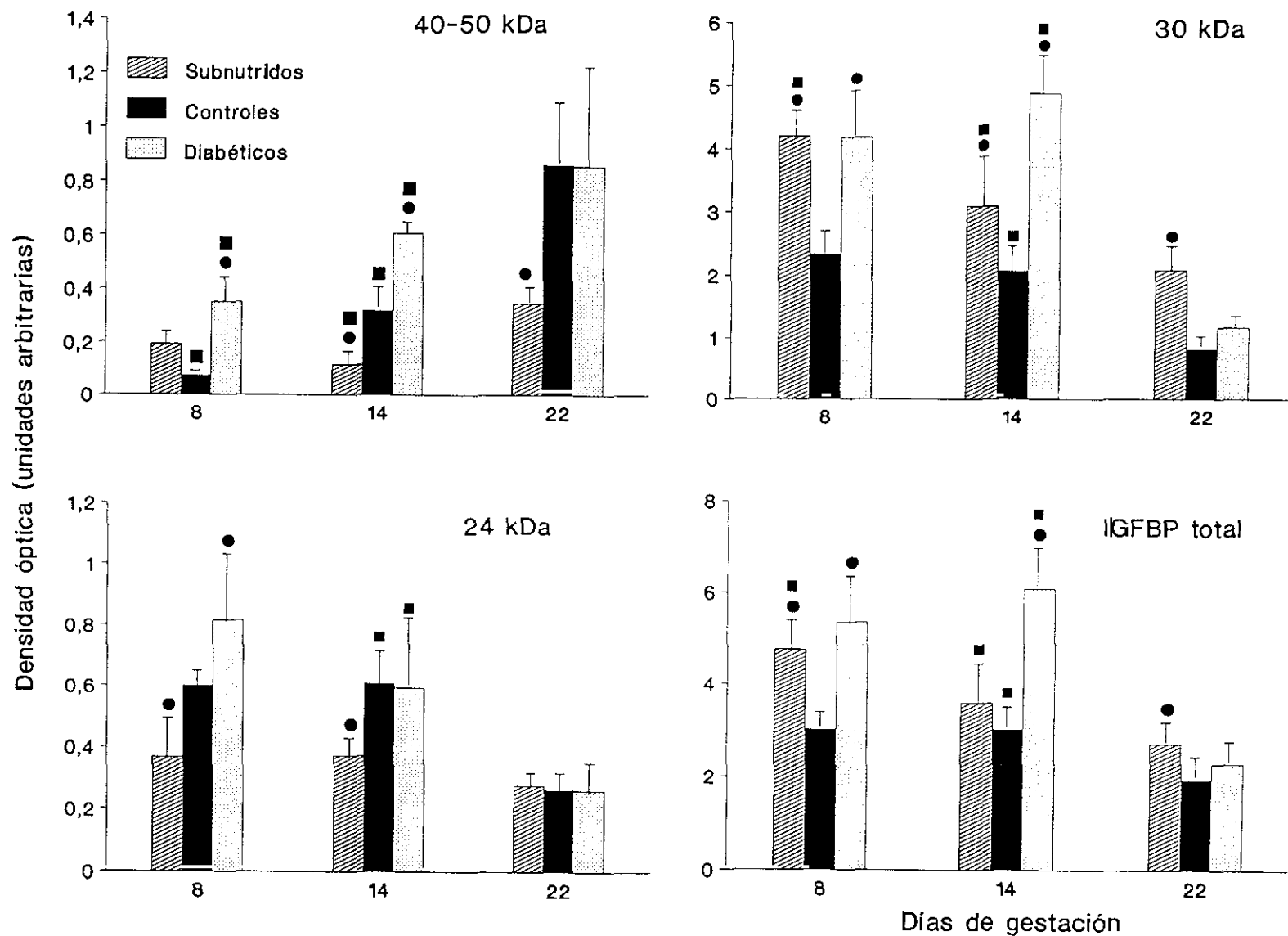


**Figura 3.18.** Análisis mediante "Western ligand blot" de las IGFBPs del suero de ratas subnutridas, diabéticas y sus controles alimentadas ad libitum, en periodo neonatal. La cantidad de suero analizada fue de 2,5  $\mu$ l. Las membranas fueron incubadas con  $0,5 \times 10^6$  cpm de  $^{125}$ I-IGF-II; el tiempo de exposición fue de 66 horas. A la izquierda, patrones de pesos moleculares (en kDa).



**Figura 3.19.** Análisis comparativo mediante "Western ligand blot" y "Western immunoblot" de las IGFBPs del suero de ratas subnutridas (S), diabéticas (D) y sus controles (C) alimentadas ad libitum, en periodo neonatal. Se analizaron dos muestras de cada población. La cantidad de suero analizada fue de 2,5  $\mu$ l. Para el "ligand blot" las membranas fueron incubadas con  $0,5 \times 10^6$  cpm de  $^{125}$ I-IGF-II; el tiempo de exposición fue de 66 horas. Para el "immunoblot" se empleó antisuero anti-bGFBP-2. A la izquierda, patrones de pesos moleculares (en kDa).

**Figura 3.20. IGFBPs en suero neonatal.** Cuantificación densitométrica de las autorradiografías de la figura 3.18. (IGFBPs en suero neonatal). El resultado se expresa como unidades arbitrarias. Media  $\pm$  DE de 5 - 6 animales. ● Significación estadística con respecto al grupo control. ■ Significación estadística con respecto al grupo de edad inmediatamente superior.



**Tabla 3.8. IGFBP<sub>s</sub> en suero neonatal. Cuantificación densitométrica de las autorradiografías de la figura 3.18. Los resultados de la cuantificación de los tres grupos de bandas se expresan como tanto por ciento de densidad óptica de cada banda con respecto a la densidad óptica total de la muestra correspondiente.**

Banda		Edad (días)		
		8	14	22
<b>40-50 kDa</b>	Subnutridos	3,99 ± 0,38	3,23 ± 0,54 <sup>a,b</sup>	12,88 ± 0,59 <sup>a</sup>
	Controles	2,49 ± 0,30 <sup>b</sup>	10,48 ± 1,80 <sup>b</sup>	44,03 ± 4,54
	Diabéticos	6,68 ± 2,19 <sup>a</sup>	10,16 ± 1,97	36,33 ± 10,62
<b>30 kDa</b>	Subnutridos	88,39 ± 2,17 <sup>a</sup>	86,01 ± 2,53 <sup>a,b</sup>	76,77 ± 1,63 <sup>a</sup>
	Controles	77,43 ± 2,04 <sup>b</sup>	68,71 ± 2,53 <sup>b</sup>	42,16 ± 5,36
	Diabéticos	78,20 ± 2,80	80,32 ± 1,18 <sup>a,b</sup>	52,37 ± 10,57 <sup>a</sup>
<b>24 kDa</b>	Subnutridos	7,61 ± 1,87 <sup>a</sup>	10,76 ± 2,36 <sup>a</sup>	10,36 ± 1,46
	Controles	20,07 ± 1,84	20,30 ± 2,50 <sup>b</sup>	13,81 ± 2,83
	Diabéticos	15,12 ± 1,54 <sup>a</sup>	12,31 ± 2,44 <sup>a</sup>	11,30 ± 1,79

Media ± DE.

<sup>a</sup> Significación estadística con respecto al grupo control.

<sup>b</sup> Significación estadística con respecto al grupo de edad inmediatamente superior.

### **3.3.5.1. Hígado.**

No se recoge en la tabla 3.9. el resultado del estudio de ligamiento específico de IGF-I a las preparaciones de membrana plasmática de hígado debido a que a 14 y 22 días no hubo diferencias significativas entre el ligamiento específico y el inespecífico en ninguna de las poblaciones. A 8 días el resultado obtenido fue de  $1,13 \pm 0,04\%$  para las ratas control,  $1,06 \pm 0,34$  para las subnutridas y  $0,92 \pm 0,64$  para las diabéticas; no hubo diferencias estadísticamente significativas entre estos resultados.

El ligamiento de IGF-II experimentó un descenso progresivo en las tres poblaciones a lo largo del periodo de estudio. Los animales subnutridos presentaron un porcentaje de ligamiento específico significativamente inferior (entre un 30 y un 45%) al de sus controles. Por el contrario, el porcentaje de ligamiento específico de los animales diabéticos fue significativamente más alto que el de los controles a 8 y 14 días (30% y 40% respectivamente).

Para averiguar si los cambios en el ligamiento específico de IGF-II a membranas de hígado causados por la subnutrición y la diabetes tienen su origen en alteraciones de la afinidad por el ligando de los sitios de unión se determinó, mediante análisis de Scatchard, la constante de afinidad del ligamiento de este péptido. El resultado del análisis de 2 o 3 preparaciones de membrana de cada población a 8, 14 y 22 días se muestra también en la tabla 3.9. En todos los casos los trazados resultantes se ajustaban bien a líneas rectas (en la figura 3.21. se muestra un ejemplo). Los valores de  $K_a$  obtenidos oscilaron entre  $1,36$  y  $2,25 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$ , sin que variaran significativamente entre los distintos grupos.

### **3.3.5.2. Cerebro.**

El porcentaje de unión específica de IGF-I a membranas de cerebro fue muy bajo y no mostró diferencias significativas entre neonatos subnutridos o diabéticos y sus controles. No hubo cambios significativos tampoco entre los distintos estadios.

Por lo que respecta al ligamiento específico de IGF-II, no se observaron cambios significativos ni con la edad ni con el tratamiento, a excepción de los neonatos diabéticos de 14 días, en que fue significativamente inferior al de sus controles. En todos los casos este parámetro se situó entre el 4 y el 6% aproximadamente.

### **3.3.6. Estudio de regresión y correlación.**

Se efectuó el análisis de regresión y correlación de diversos parámetros de las ratas en periodo neonatal (tabla 3.10.). Para los cálculos se reunieron en cada análisis los datos



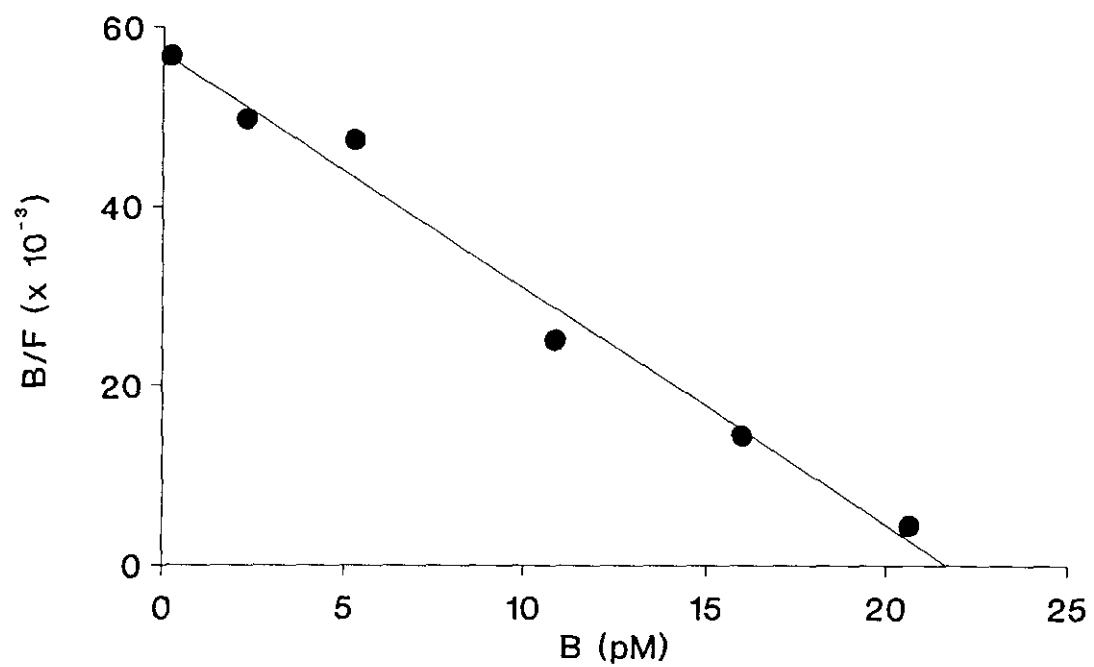
**Tabla 3.9.** *Ligamiento específico de IGF-I y II a preparaciones de membrana plasmática de hígado y cerebro de ratas subnutridas (desde el día 16 de gestación), diabéticas (inyección de STZ el día 4) y sus controles alimentados ad libitum, en periodo neonatal. Se incluyen también las constantes de afinidad del ligamiento de IGF-II a membranas de hígado, calculadas a partir de la representación de Scatchard.*

Edad (días)		IGF-I	IGF-II		
		Cerebro	Hígado	$K_a (\times 10^9 \text{ M}^{-1})$	Cerebro
8	Subnutridos	$1,85 \pm 0,83$	$6,25 \pm 0,01^a$	$1,63 \pm 0,27$	$5,73 \pm 0,72$
	Controles	$1,47 \pm 0,18$	$8,70 \pm 1,39$	$1,36 \pm 0,13$	$5,61 \pm 0,05$
	Diabéticos	$2,74 \pm 0,64$	$12,16 \pm 0,88^{a,b}$	$2,25 \pm 0,84$	$5,18 \pm 0,37$
14	Subnutridos	$1,15 \pm 0,47$	$4,63 \pm 0,37^{a,b}$	$1,50 \pm 0,38$	$5,41 \pm 0,77$
	Controles	$1,20 \pm 0,24$	$7,74 \pm 0,93^b$	$2,33 \pm 0,36$	$5,48 \pm 0,18$
	Diabéticos	$1,26 \pm 0,34$	$9,81 \pm 0,97^{a,b}$	$2,15 \pm 0,06$	$4,31 \pm 0,32^a$
22	Subnutridos	$2,01 \pm 0,19$	$2,88 \pm 0,18^a$	$1,75 \pm 0,60$	$4,36 \pm 0,72$
	Controles	$1,74 \pm 0,60$	$5,19 \pm 0,57$	$1,80 \pm 0,44$	$4,91 \pm 0,35$
	Diabéticos	$1,37 \pm 0,40$	$5,51 \pm 0,94$	$2,10 \pm 0,76$	$4,45 \pm 0,17$

Media  $\pm$  DE de 2 - 3 muestras analizadas por cuadruplicado.

<sup>a</sup> Significación estadística con respecto al grupo control.

<sup>b</sup> Significación estadística con respecto al grupo de edad inmediatamente superior.



**Figura 3.21.** Representación de Scatchard de un experimento de ligamiento de IGF-II a una preparación de membrana plasmática de hígado de rata control alimentada ad libitum de 14 días. Cada punto representa la media de cuatro determinaciones.

de las tres edades estudiadas. Las figuras 3.22. y 3.23. muestran la representación gráfica de alguno de estos análisis que consideramos más relevantes.

Se observó muy buena correlación positiva ( $r = 0,83$  a  $0,92$ ) entre IGF-I y el peso corporal y entre IGF-I y la insulinemia en las poblaciones de ratas subnutridas y controles; en las diabéticas se obtuvo también correlación positiva entre IGF-I y el peso corporal, aunque no tan alta ( $r = 0,60$ ) como en las otras dos poblaciones, pero no se observó entre IGF-I y la insulinemia. La insulinemia de las ratas subnutridas y controles se correlacionó positivamente con el peso corporal; esta correlación no se observó en las ratas diabéticas.

La IGFBP de 30 kDa (en unidades arbitrarias) se correlacionó inversamente con el peso corporal y con IGF-I en las tres poblaciones, con  $r$  entre  $-0,89$  y  $-0,82$  (excepto en ratas diabéticas donde  $r$  fue  $-0,60$ ). La correlación con la insulinemia, también negativa, fue significativa en animales subnutridos y controles. Con la glucemia se obtuvo muy buena correlación negativa ( $r = -0,87$ ) sólo en los animales diabéticos.

### **3.3.7. Resumen de los resultados obtenidos en rata neonatal.**

Las dos situaciones estudiadas, subnutrición y diabetes, provocaron en la rata neonatal un retardo del crecimiento, más marcado en la diabetes, junto con un descenso en los niveles de IGF-I en suero. IGF-II, por el contrario, sólo se vio alterado en la rata diabética en etapas precoces. Ambas situaciones se acompañaron de hipoinsulinemia, pero mientras que los neonatos subnutridos eran hipoglucémicos, los diabéticos eran marcadamente hiperglucémicos.

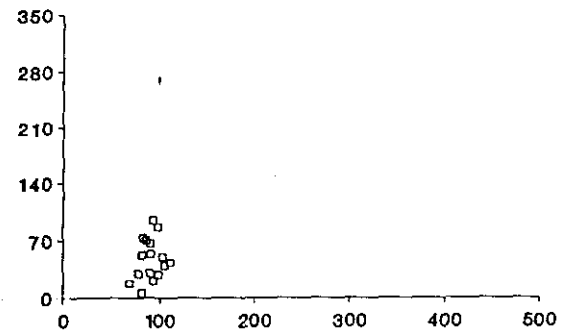
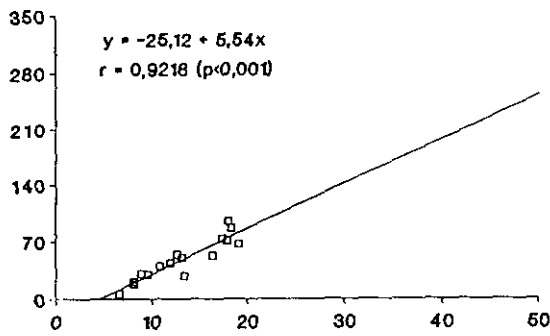
En periodo neonatal la IGFBP más abundante es todavía una forma de unos 30 kDa. Tanto la subnutrición como la diabetes provocan una elevación en la intensidad de esta banda ("Western ligand blot"), pero su efecto sobre las distintas especies de IGFBPs parece diferente, a juzgar por el "immunoblot".

Finalmente, ambas situaciones produjeron alteraciones de signo contrario en el ligamiento específico de IGF-II a membranas de hígado, con aumento en la diabetes y disminución en la subnutrición.

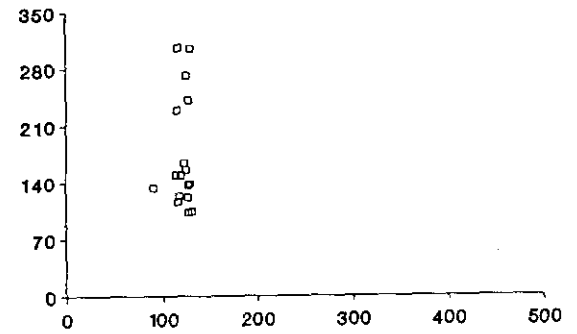
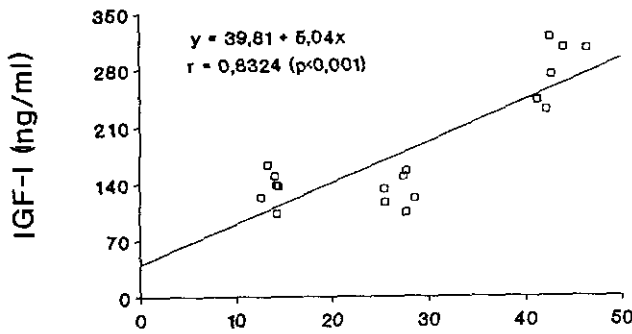
**Tabla 3.10.** *Análisis de regresión lineal y correlación de diversos parámetros de las ratas subnutridas, diabéticas y sus controles alimentados ad libitum, en periodo neonatal. Para cada población se reunieron los datos de 8, 14 y 22 días.*

		Subnutridos	Controles	Diabéticos
<b>IGF-I</b> frente a	Peso corporal	$y = -25,12 + 5,54x$ $r = 0,9218 \text{ } p < 0,001$	$y = 39,81 + 5,04x$ $r = 0,8324 \text{ } p < 0,001$	$y = 54,28 + 1,74x$ $r = 0,5989 \text{ } p < 0,05$
	Glucemia	$y = -31,3 + 0,84x$ $r = 0,4215 \text{ NS}$	$y = 192,07 - 0,09x$ $r = -0,0146 \text{ NS}$	$y = -10,26 + 0,28x$ $r = 0,6677 \text{ } p < 0,01$
	Insulinemia	$y = 13,28 + 21,43x$ $r = 0,8312 \text{ } p < 0,001$	$y = 24,13 + 62,16x$ $r = 0,9198 \text{ } p < 0,001$	$y = 103,86 - 10,62x$ $r = -0,1292 \text{ NS}$
<b>IGFBP 30 kDa</b> frente a	Peso corporal	$y = 5600,94 - 198,12x$ $r = -0,8363 \text{ } p < 0,001$	$y = 3220,51 - 52,84x$ $r = -0,8930 \text{ } p < 0,001$	$y = 6440,34 - 145,33x$ $r = -0,8691 \text{ } p < 0,001$
	Glucemia	$y = 6950,40 - 41,54x$ $r = -0,4834 \text{ } p < 0,05$	$y = 3137,79 - 11,64x$ $r = -0,1423 \text{ NS}$	$y = 11352,12 - 22,35x$ $r = -0,8770 \text{ } p < 0,001$
	Insulinemia	$y = 4343,42 - 778,22x$ $r = -0,7123 \text{ } p < 0,01$	$y = 3198,11 - 589,70x$ $r = -0,8807 \text{ } p < 0,001$	$y = 2286,70 + 651,71x$ $r = 0,1082 \text{ NS}$
	IGF-I	$y = 4491,83 - 31,91x$ $r = -0,8202 \text{ } p < 0,001$	$y = 3223,94 - 8,19x$ $r = -0,8384 \text{ } p < 0,001$	$y = 6680,77 - 37,92x$ $r = -0,5996 \text{ } p < 0,05$
<b>Glucemia</b> frente a	Peso corporal	$y = 79,73 + 0,90x$ $r = 0,3195 \text{ NS}$	$y = 121,02 - 0,01x$ $r = -0,1038 \text{ NS}$	$y = 276,23 + 3,92x$ $r = 0,5528 \text{ NS}$
<b>Insulinemia</b> frente a	Peso corporal	$y = -0,89 + 0,19x$ $r = 0,8704 \text{ } p < 0,001$	$y = 0,32 + 0,08x$ $r = 0,8682 \text{ } p < 0,001$	$y = 1,32 + 0,002x$ $r = 0,0721 \text{ NS}$

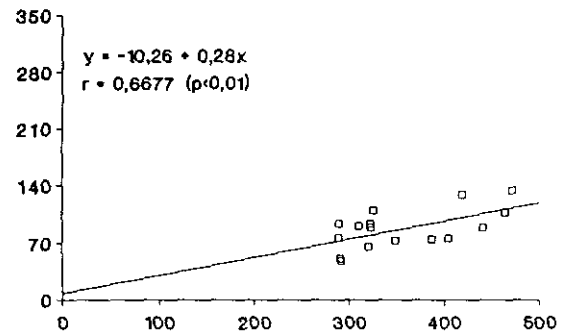
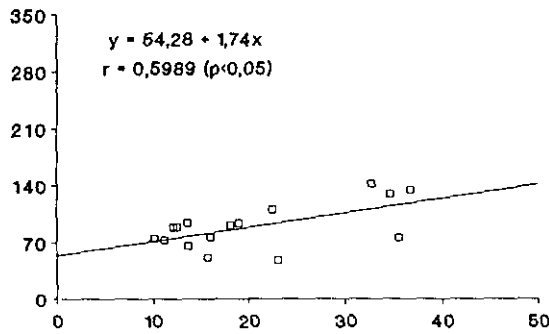
### SUBNUTRIDOS



### CONTROLES



### DIABETICOS



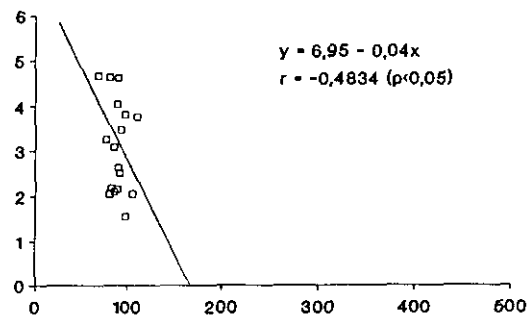
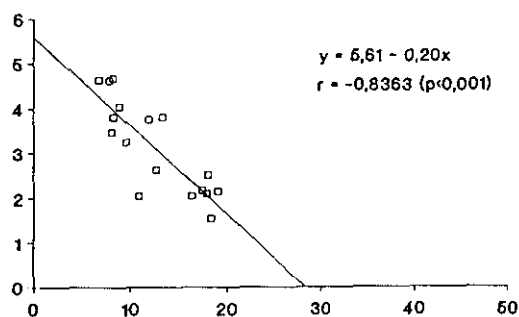
Peso (g)

Glucemia (mg/100ml)

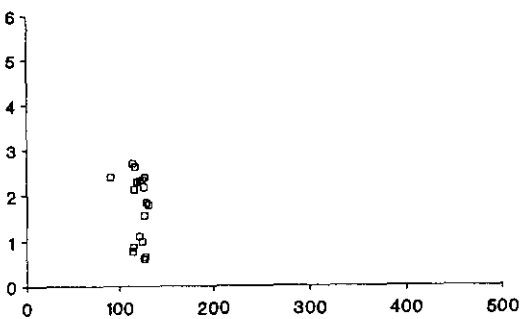
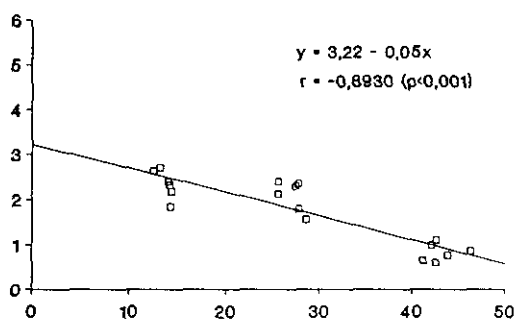
**Figura 3.22.** Análisis de regresión lineal y correlación de algunos parámetros en ratas subnutridas, diabéticas y sus controles alimentados ad libitum en periodo neonatal. Para cada población se reunieron los datos de 8, 14 y 22 días.

IGFBP 30 kDa (U. arbitrarias)

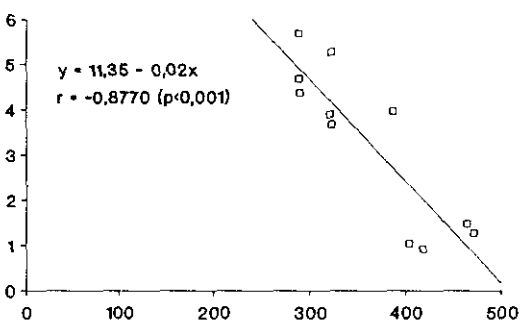
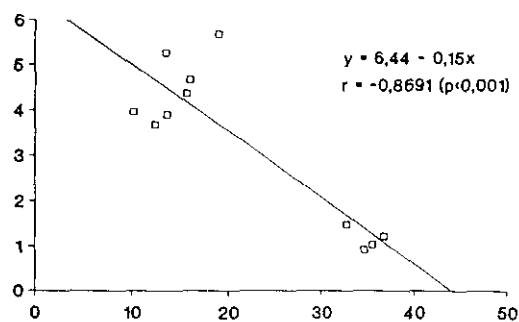
### SUBNUTRIDOS



### CONTROLES



### DIABETICOS



Peso (g)

Glucemia (mg/100ml)

**Figura 3.23.** Análisis de regresión lineal y correlación de algunos parámetros en ratas subnutridas, diabéticas y sus controles alimentados ad libitum en periodo neonatal. Para cada población se reunieron los datos de 8, 14 y 22 días.

### **3.4. Realimentación de ratas, neonatales y adultas, subnutridas desde la gestación**

Para profundizar en el estudio del papel de los nutrientes en la regulación de la secreción de IGFs y sus proteínas ligadoras en etapa postnatal, se efectuaron estudios de rehabilitación nutricional, tanto en etapa lactante como en etapa adulta, de ratas subnutridas desde el día 16 de gestación. La realimentación se llevó a cabo según la pauta que se especifica en 2.1.3. durante un periodo de 6 días, transcurridos los cuales los animales fueron sacrificados y se recogieron muestras de suero y tejidos. Se obtuvieron muestras también de neonatos, subnutridos y controles, antes del inicio de la realimentación. En las muestras de suero se determinaron la insulinemia y los niveles de IGF-I y (sólo en neonatos) de IGF-II, y se analizaron las IGFBPs mediante "Western ligand blot" y "Western immunoblot".

#### **3.4.1. Realimentación de ratas neonatales subnutridas.**

##### **3.4.1.1. Peso, glucemia e insulinemia.**

En la tabla 3.11. se recogen los resultados del peso corporal, la glucemia y la insulinemia de las ratas neonatales de este experimento, tanto al inicio (8 días) como al final del mismo (14 días). Estos resultados a 14 días, junto con las determinaciones de IGF-I y II en suero, se presentan también en forma de gráfico en la figura 3.24.

Las ratas subnutridas presentaron, tanto a 8 como a 14 días, un peso corporal inferior y niveles de insulina significativamente más bajos (en torno al 50%) que los observados en las ratas control de su misma edad. La glucemia fue también inferior en la población de ratas subnutridas, tanto a 8 como a 14 días. En ambas poblaciones se produjo un incremento de peso entre los días inicial y final del experimento. En las ratas realimentadas se observó una recuperación del peso corporal y de la glucemia, de tal manera que a 14 días no hubo diferencia significativa con las ratas control de la misma edad; la insulina, en cambio, se encontró significativamente más elevada (un 33%).

##### **3.4.1.2. Niveles de IGF-I y II en suero.**

Los niveles de IGF-I en suero fueron notablemente más bajos en los animales subnutridos que en los controles tanto a 8 (90%) como a 14 días (70%) (Tabla 3.11.), y aunque hubo una marcada recuperación en las ratas realimentadas, a 14 días la concentración de este péptido en suero fue aún significativamente inferior a la de las ratas control (Fig. 3.24.).

Los niveles de IGF-II experimentaron un descenso significativo entre 8 y 14 días, tanto en los neonatos controles como en los subnutridos. El análisis estadístico no mostró

diferencias significativas entre estas dos poblaciones, ni entre los animales realimentados y sus controles a 14 días (Tabla 3.11. y Fig. 3.24.).

#### **3.4.1.3. Análisis de las IGFBPs en suero mediante "Western ligand blot" y "Western immunoblot".**

Para el estudio de las IGFBPs circulantes se seleccionaron al azar cuatro muestras de cada población y se analizaron 2,5  $\mu$ l de suero de cada una de ellas en un mismo gel (Fig. 3.25.). En la misma membrana de nitrocelulosa se efectuaron sucesivamente el análisis mediante "Western ligand blot" y mediante "Western immunoblot" con antisuero anti-bIGFBP-2.

El patrón de bandas que muestra la figura 3.25. es similar al ya comentado en 3.3.4.; la forma más abundante corresponde a la banda de 30 kDa, que es más intensa en las ratas subnutridas, especialmente a 8 días. Se observa también una banda nítida a 24 kDa, cuya intensidad es claramente menor en las ratas subnutridas. Por último se aprecian, a 40-50 kDa un grupo de 2 bandas y a 20 kDa una banda, todas ellas muy tenues. El "immunoblot" revela una banda intensa de 30 kDa y una banda menos nítida de 31 kDa; aunque las diferencias entre las tres poblaciones estudiadas no son muy marcadas, sí puede apreciarse una intensidad ligeramente mayor de esta banda en el suero de los animales subnutridos.

##### **3.4.1.3.1. Cuantificación densitométrica.**

El resultado de la cuantificación de la autorradiografía de la figura 3.25. se recoge en la tabla 3.12. Los resultados obtenidos al final del experimento (14 días) se presentan también en forma de gráfico en la figura 3.27.A. La intensidad de cada banda se expresa en valor absoluto (unidades arbitrarias). Los cambios observados a 8 y 14 días en las ratas subnutridas son similares a los ya descritos en 3.3.4.: menor intensidad de las bandas de 40-50 kDa, 24 kDa y además 21 kDa (que no se observó en la autorradiografía de la figura 3.18.), y mayor intensidad en la banda de 30 kDa. Las ratas realimentadas presentaron al final del experimento un patrón de bandas similar al de las controles de la misma edad.

#### **3.4.2. Realimentación de ratas adultas subnutridas.**

##### **3.4.2.1. Peso, glucemia e insulinemia.**

En la figura 3.24. se recogen los resultados del peso corporal, la glucemia y la insulinemia de las ratas adultas al final del experimento. El peso de las ratas subnutridas fue aproximadamente un 40% del que presentaron las controles; las ratas realimentadas



**Tabla 3.11.** *Peso, glucemia, insulinemia y concentración de IGF-I e IGF-II en suero de ratas subnutridas, controles alimentadas ad libitum, y subnutridas realimentadas durante 6 días, en periodo neonatal.*

		<b>Peso (g)</b>	<b>Glucemia (mg/100 ml)</b>	<b>Insulinemia (ng/ml)</b>	<b>IGF-I (ng/ml)</b>	<b>IGF-II (ng/ml)</b>
<b>8 días</b>	Subnutridas	7,9 ± 0,6 <sup>a,b</sup>	83,3 ± 9,8 <sup>a</sup>	0,92 ± 0,05 <sup>a</sup>	12,2 ± 12,5 <sup>a,b</sup>	642,1 ± 147,2 <sup>b</sup>
	Controles	13,8 ± 0,6 <sup>b</sup>	121,1 ± 5,6	1,68 ± 0,21	135,2 ± 21,2	731,5 ± 113,9 <sup>b</sup>
<b>14 días</b>	Subnutridas	11,9 ± 1,9 <sup>a</sup>	94,9 ± 11,4 <sup>a</sup>	0,83 ± 0,12 <sup>a</sup>	40,4 ± 10,3 <sup>a</sup>	485,0 ± 48,1
	Controles	27,1 ± 1,1	121,2 ± 5,8	1,83 ± 0,33	129,4 ± 19,5	396,7 ± 53,7
	Realimentadas	25,9 ± 1,1 <sup>c,d</sup>	132,0 ± 3,2 <sup>cd</sup>	2,43 ± 0,32 <sup>a,c,d</sup>	104,5 ± 20,3 <sup>a,c,d</sup>	328,1 ± 68,4 <sup>c,d</sup>

Media ± DE de 5 a 8 animales.

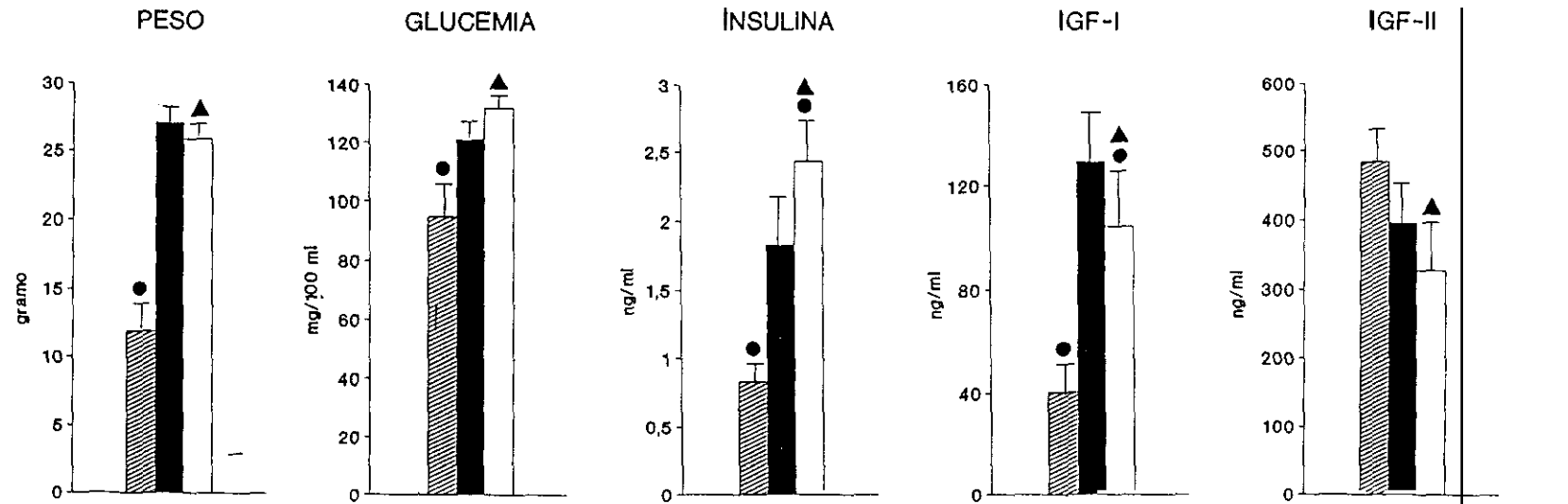
<sup>a</sup> Significación estadística con respecto al grupo control.

<sup>b</sup> Significación estadística con respecto al grupo de edad inmediatamente superior.

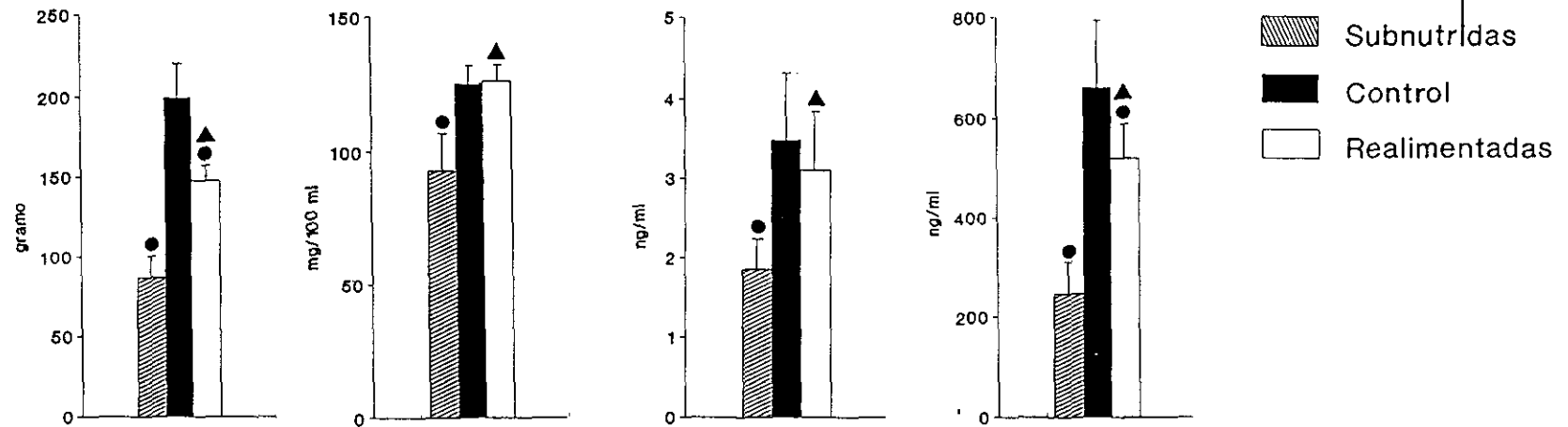
<sup>c</sup> Significación estadística con respecto a la población de ratas subnutridas de 8 días.

<sup>d</sup> Significación estadística con respecto a la población de ratas subnutridas de 14 días.

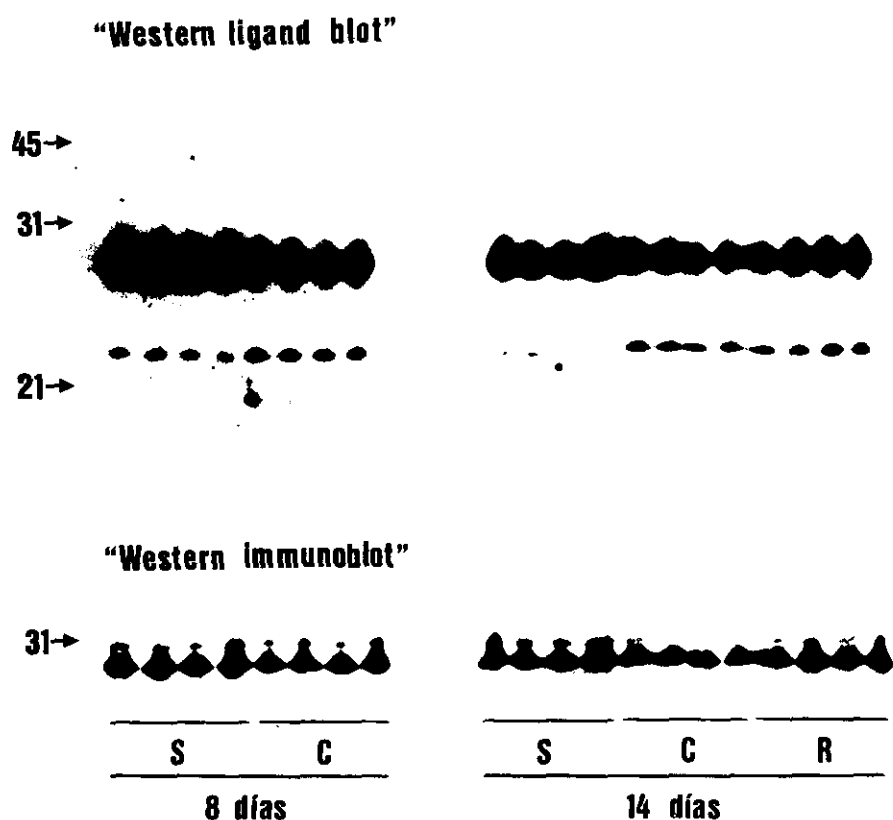
# NEONATOS



# ADULTOS



**Figura 3.24.** *Peso corporal, glucemia, insulinemia y concentración de IGF-I y II en suero de ratas subnutridas, controles alimentadas ad libitum y realimentadas durante 6 días en periodo neonatal y adulto. Media  $\pm$  DE de 5 - 6 animales. ● Significación estadística con respecto al grupo control. ▲ Significación estadística con respecto al grupo de ratas subnutridas.*



**Figura 3.25.** Análisis comparativo mediante "Western ligand blot" y "Western immunoblot" de las IGFBPs del suero de ratas subnutridas desde el día 16 de gestación (S), controles alimentadas ad libitum (C) y realimentadas durante 6 días (R) en periodo neonatal. Se analizaron cuatro muestras de cada población, tanto al inicio (8 días) como al final (14 días) de la realimentación. La cantidad de suero analizada fue de 2,5  $\mu$ l. Para el "ligand blot" las membranas fueron incubadas con  $2,5 \times 10^6$  cpm de  $^{125}$ I-IGF-II; el tiempo de exposición fue de 90 horas. Para el "immunoblot" se empleó antisuero anti-bGFBP-2. A la izquierda, patrones de pesos moleculares (en kDa).

**Tabla 3.12.** Cuantificación densitométrica de la autorradiografía de la figura 3.25. (IGFBPs en suero neonatal).

		Densidad óptica (unidades arbitrarias)				
		40-50 kDa	30 kDa	24 kDa	20 kDa	Total
8 días	Subnutridas	81,2 ± 21,9 <sup>a</sup>	3949,8 ± 420,5 <sup>a</sup>	193,2 ± 82,5 <sup>a</sup>	63,5 ± 26,1 <sup>a</sup>	4287,6 ± 507,0 <sup>a,b</sup>
	Controles	258,1 ± 63,8	2594,8 ± 306,1	443,6 ± 24,6	194,1 ± 98,7	3490,6 ± 259,8
14 días	Subnutridas	39,3 ± 12,4 <sup>a</sup>	3136,5 ± 574,6 <sup>a</sup>	259,9 ± 33,1 <sup>a</sup>	22,7 ± 7,5 <sup>a</sup>	3458,5 ± 589,6
	Controles	200,0 ± 34,1	2144,8 ± 209,0	530,0 ± 70,3	116,2 ± 46,3	2990,5 ± 260,1
	Realimentadas	221,6 ± 95,5 <sup>c,d</sup>	2389,3 ± 105,5 <sup>c,d</sup>	540,5 ± 50,5 <sup>c,d</sup>	181,4 ± 27,0 <sup>c,d</sup>	3332,7 ± 177,6 <sup>c</sup>

Media ± DE.

<sup>a</sup> Significación estadística con respecto al grupo control.

<sup>b</sup> Significación estadística con respecto al grupo de edad inmediatamente superior.

<sup>c</sup> Significación estadística con respecto a la población de ratas subnutridas de 8 días.

<sup>d</sup> Significación estadística con respecto a la población de ratas subnutridas de 14 días.

recuperaron un 34% de peso (con respecto a las controles) tras 6 días de realimentación, con lo que su peso fue aún significativamente inferior al de las controles.

También la glucemia y la insulinemia fueron significativamente inferiores (esta última un 47% aproximadamente) en las ratas subnutridas, y ambos parámetros se recuperaron al final del experimento.

#### **3.4.2.2. Niveles de IGF-I en suero.**

Los niveles de IGF-I en suero, determinados al final del experimento (Fig. 3.24.), fueron significativamente más bajos (40% aproximadamente) en las ratas subnutridas que los encontrados en las controles. La realimentación supuso una recuperación parcial (un 38% aproximadamente) de la concentración de esta hormona, que fue todavía significativamente inferior a la de las ratas control.

#### **3.4.2.3. Análisis de las IGFBPs en suero mediante "Western ligand blot" y "Western immunoblot".**

En un mismo gel se analizaron 2,5  $\mu$ l de suero de cada una de las muestras de las tres poblaciones: subnutridas, controles y realimentadas (Fig. 3.26.). En la misma membrana de nitrocelulosa se efectuaron sucesivamente el análisis mediante "Western ligand blot" y mediante "Western immunoblot" con antisuero anti-bIGFBP-2. Para esta última prueba fue necesario prolongar el tiempo de revelado de la membrana para obtener una señal clara, de ahí el fondo relativamente intenso que se observa.

En la autorradiografía se obtuvo, en las ratas control, el patrón de bandas característico de la rata adulta, donde la forma predominante es el grupo de bandas de 40-50 kDa. Se aprecian claramente también dos bandas intensas de 28 y 30 kDa, una banda tenue de 24 kDa y, finalmente, una banda, apenas visible, de 20 kDa. En los animales subnutridos se observa un marcado descenso en la intensidad de todas las bandas, que se recupera parcialmente en los realimentados.

El "immunoblot" reveló una banda de 30 kDa en las tres poblaciones, claramente más intensa en las ratas subnutridas; la realimentación provocó un claro descenso en la intensidad de esta banda.

##### **3.4.2.3.1. Cuantificación densitométrica.**

En la figura 3.27.B se presenta en forma de gráfico el resultado de la cuantificación de la autorradiografía de la figura 3.26. La intensidad de cada banda se expresa en valor absoluto (unidades arbitrarias). En las tres poblaciones el grupo de bandas de 40-50 kDa,

la forma más abundante, constituye entre un 53 y un 60% y el grupo de bandas entre 27 y 30 kDa (que incluye las bandas de 28 y 30 kDa) constituye entre un 35 y un 42% de la IGFBP total detectable con este método. Las bandas de 24 y 20 kDa suponen menos del 7% de la IGFBP total. En las ratas subnutridas se observó un descenso de un 70-80% en la intensidad de todas las bandas (la de 20 kDa no se detectó). En las ratas realimentadas se produjo una recuperación completa en las bandas de 24 y 20 kDa; en las bandas de 40-50 y 28 kDa esta recuperación fue parcial (de un 25% aproximadamente, con respecto a los controles). Por último, no se produjo ningún cambio en la banda de 30 kDa. La IGFBP total refleja los cambios que se producen en las formas más abundantes: tanto en las ratas subnutridas como en las realimentadas la IGFBP total fue significativamente menor (un 21,6% y un 48,3%, respectivamente) que la presente en las controles.

#### **3.4.2.4. Estudio de regresión lineal y correlación.**

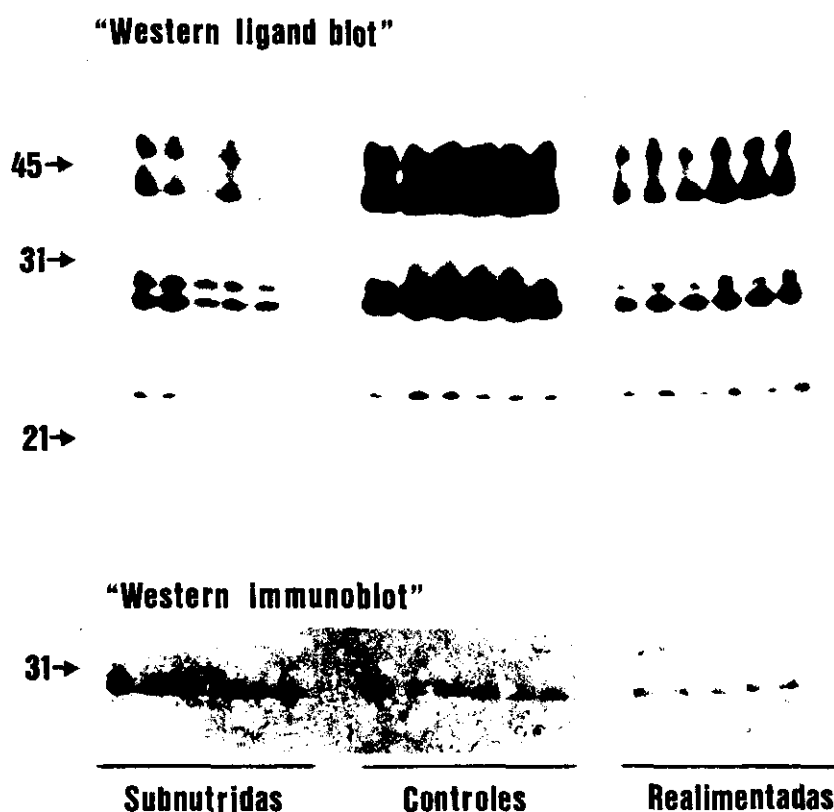
Las tablas 3.13. y 3.14. resumen los resultados del análisis de regresión de los parámetros estudiados en los experimentos de realimentación que se acaban de describir. Los resultados de la tabla 3.13. corresponden al estudio en periodo neonatal y los de la tabla 3.14. corresponden al estudio en periodo adulto. Para este análisis se reunieron, en ambos casos, los datos obtenidos en las tres poblaciones al final del experimento.

Tanto en neonatos como en adultos se encontró una correlación muy buena entre IGF-I y el peso corporal ( $r$  en torno a 0,9). También fue buena entre IGF-I y las distintas formas de IGFBPs, en las ratas adultas, donde  $r$  varió entre 0,81 y 0,94; en los neonatos, aunque significativa, la correlación fue menor, y con la IGFBP de 30 kDa fue negativa ( $r = -0,74$ ). La correlación entre IGF-I y la insulinemia fue similar en adultos y en neonatos ( $r$  en torno a 0,6), pero la correlación entre IGF-I y la glucemia fue mejor en las ratas adultas ( $r = 0,82$ ;  $p < 0,001$ ) que en los neonatos ( $r = 0,57$ ;  $p < 0,05$ ).

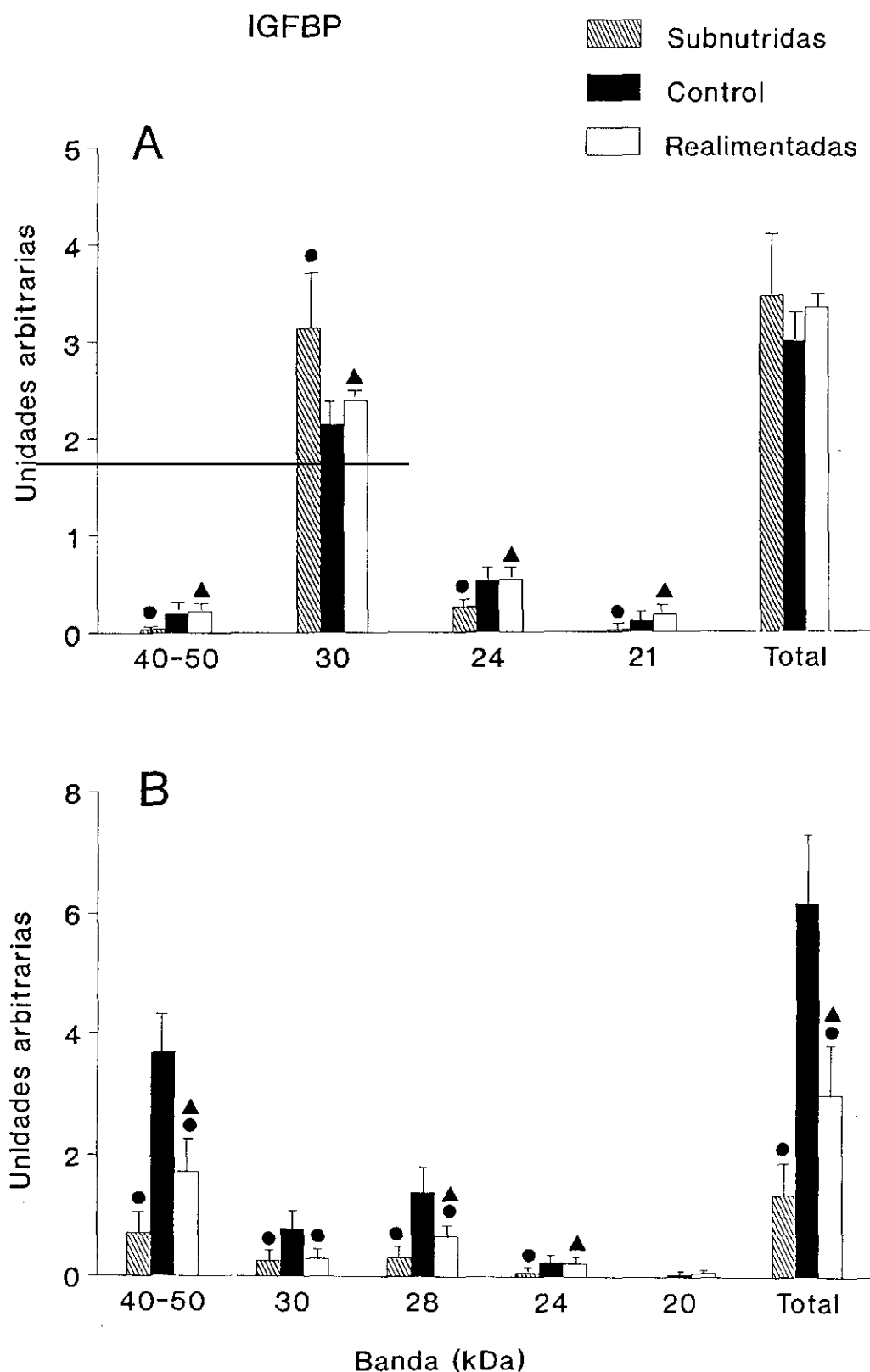
En los neonatos se observó una correlación negativa entre IGF-II y el peso, la glucemia, la insulinemia y las distintas formas de IGFBPs (a excepción de la de 30 kDa, en que  $r$  no fue significativo).

El comportamiento de las bandas de IGFBP de 30 kDa frente al peso corporal, la glucemia y la insulinemia en rata neonatal fue muy distinto al observado en adulto con las bandas de 28 y 30 kDa. Mientras que en el neonato las correlaciones fueron todas negativas y  $r$  no fue significativo para la glucemia, en adulto fueron positivas, y no se halló significación estadística entre la banda de 30 kDa y los niveles de insulina.

Por último, encontramos una buena correlación positiva (con  $r$  por encima de 0,7) entre el peso corporal y la glucemia, insulinemia y todas las formas de IGFBPs (excepto 50 kDa en neonatos, como ya se ha comentado) en ambos experimentos.



**Figura 3.26.** Análisis comparativo mediante "Western ligand blot" y "Western immunoblot" de las IGFBPs del suero de ratas subnutridas desde el día 16 de gestación (S), controles alimentadas ad libitum (C) y realimentadas durante 6 días (R) en periodo adulto. Se analizaron seis muestras de cada población al final del periodo de realimentación. La cantidad de suero analizada fue de 2,5  $\mu$ l. Para el "ligand blot" las membranas fueron incubadas con  $2,5 \times 10^6$  cpm de  $^{125}$ I-IGF-II; el tiempo de exposición fue de 66 horas. Para el "immunoblot" se empleó antisuero anti-bGFBP-2. A la izquierda, patrones de pesos moleculares (en kDa).



**Figura 3.27.** Cuantificación densitométrica de las autorradiografías de las figuras 3.25. (IGFBPs en suero neonatal, A) y 3.26 (IGFBPs en suero adulto, B). De la primera se muestra la parte correspondiente al final del periodo de realimentación. El resultado se expresa como unidades arbitrarias. Media  $\pm$  DE. ● Significación estadística con respecto al grupo control. ▲ Significación estadística con respecto al grupo de ratas subnutridas.



**Tabla 3.13.** *Análisis de regresión lineal y correlación de diversos parámetros de las ratas subnutridas (desde el día 16 de gestación), controles (alimentadas ad libitum) y realimentadas durante 6 días, en periodo neonatal. Este análisis se efectuó reuniendo los datos de las tres poblaciones al final del experimento.*

		Ecuación de la recta	r	p
<b>IGF-I</b> frente a	Peso corporal	$y = -18,80 + 5,09x$	0,8798	$p < 0,001$
	Glucemia	$y = -60,00 + 1,31x$	0,5693	$p < 0,05$
	Insulinemia	$y = 26,34 - 0,66x$	0,6635	$p < 0,01$
	IGFBP 40-50 kDa	$y = 37,92 + 0,32x$	0,7640	$p < 0,01$
	IGFBP 30 kDa	$y = 232,21 - 0,06x$	-0,7413	$p < 0,01$
	IGFBP 24 kDa	$y = -18,69 + 0,24x$	0,8186	$p < 0,01$
	IGFBP 20 kDa	$y = 46,16 + 0,38x$	0,6718	$p < 0,05$
<b>IGF-II</b> frente a	Peso corporal	$y = 564,27 - 7,43x$	-0,6088	$p < 0,01$
	Glucemia	$y = 676,63 - 2,39x$	-0,5254	$p < 0,05$
	Insulinemia	$y = 549,08 - 86,28x$	-0,7371	$p < 0,001$
	IGFBP 40-50 kDa	$y = 493,76 - 0,52x$	-0,5661	$p < 0,05$
	IGFBP 30 kDa	$y = 248,43 + 0,06x$	0,3864	NS
	IGFBP 24 kDa	$y = 574,09 - 0,36x$	-0,5668	$p < 0,05$
	IGFBP 20 kDa	$y = 106,76 - 0,75x$	-0,6010	$p < 0,05$
<b>IGFBP 30 kDa</b> frente a	Peso corporal	$y = 3817,32 - 58,36x$	-0,7707	$p < 0,01$
	Glucemia	$y = 3691,96 - 9,91x$	-0,3474	NS
	Insulinemia	$y = 3329,89 - 468,99x$	-0,5850	$p < 0,05$
<b>Peso corporal</b> frente a	Glucemia	$y = -13,50 + 0,31x$	0,7766	$p < 0,001$
	Insulinemia	$y = 7,56 + 8,30x$	0,8319	$p < 0,001$
	IGFBP 40-50 kDa	$y = 12,51 + 0,06x$	0,8188	$p < 0,05$
	IGFBP 24 kDa	$y = 0,86 + 0,05x$	0,9312	$p < 0,05$
	IGFBP 20 kDa	$y = 12,76 + 0,08x$	0,8444	$p < 0,001$

**Tabla 3.14.** *Análisis de regresión lineal y correlación de diversos parámetros de las ratas subnutridas (desde el día 16 de gestación, controles (alimentadas ad libitum) y realimentadas durante 6 días, en periodo adulto. Este análisis se efectuó reuniendo los datos de las tres poblaciones al final del experimento.*

		Ecuación de la recta	r	p
<b>IGF-I</b> frente a	Peso corporal	$y = -49,29 + 3,62x$	0,9095	$p < 0,001$
	Glucemia	$y = -619,60 + 9,88x$	0,8158	$p < 0,001$
	Insulinemia	$y = 97,93 + 89,49x$	0,6215	$p < 0,01$
	IGFBP 40-50 kDa	$y = 214,87 + 0,13x$	0,8945	$p < 0,001$
	IGFBP 30 kDa	$y = 227,37 + 0,59x$	0,8121	$p < 0,001$
	IGFBP 28 kDa	$y = 200,73 + 0,37x$	0,9122	$p < 0,001$
	IGFBP 24 kDa	$y = 97,30 + 2,20x$	0,9367	$p < 0,001$
<b>IGFBP 28 kDa</b> frente a	Peso corporal	$y = -533,62 + 9,12x$	0,9010	$p < 0,001$
	Glucemia	$y = -1438,96 + 19,85x$	0,6568	$p < 0,01$
	Insulinemia	$y = -102,55 + 321,93x$	0,6133	$p < 0,01$
<b>IGFBP 30 kDa</b> frente a	Peso corporal	$y = -205,87 + 4,48x$	0,8014	$p < 0,001$
	Glucemia	$y = -485,23 + 8,28x$	0,4955	$p < 0,05$
	Insulinemia	$y = 86,41 + 131,14x$	0,4550	NS
<b>Peso corporal</b> frente a	Glucemia	$y = -134,66 + 2,49x$	0,8343	$p < 0,001$
	Insulinemia	$y = 49,79 + 36,70x$	0,7036	$p < 0,001$
	IGFBP 40-50 kDa	$y = 83,41 + 0,03x$	0,8714	$p < 0,001$
	IGFBP 24 kDa	$y = 58,53 + 0,49x$	0,8383	$p < 0,001$

### **3.4.3. Resumen de los resultados obtenidos en los experimentos de realimentación.**

Tras un periodo de realimentación de 6 días los animales subnutridos desde la gestación, tanto neonatos como adultos, recuperan la glucemia y los niveles de insulina en suero, pero no los de IGF-I, que presentan los animales controles alimentados *ad libitum*. Sólo las ratas lactantes recuperan el peso corporal, quizá correlativamente a los niveles de insulina, más elevados que los de las ratas control.

En cuanto a las IGFBPs analizadas mediante "Western ligand blot", en los neonatos se produce una recuperación del patrón de bandas de los animales control. En los adultos el periodo de realimentación no pareció ser suficiente para producir una recuperación de la intensidad de las bandas que presentaban los controles; IGFBP-2, detectada por "Western immunoblot", sí pareció retornar a los niveles presentes en las ratas control adultas.

### **3.5. Tratamiento con insulina de ratas diabéticas, neonatales y adultas**

Para estudiar del papel de la insulina en la regulación de la secreción de IGFs y sus proteínas ligadoras en etapa postnatal se efectuaron estudios de rehabilitación de ratas diabéticas mediante tratamiento con insulina, tanto en etapa lactante como en etapa adulta. La pauta de estos experimentos se especifica en 2.1.5. El motivo de no comenzar el tratamiento de los neonatos a los 8 días (inyectando la STZ a los 5 días) fue la escasa supervivencia que se observó en general con el modelo de diabetes ratas muy jóvenes y la dificultad para administrar dosis muy pequeñas de insulina. Se escogió por tanto otra edad (17 días) a la cual la supervivencia fuera adecuada y que nos permitiera completar el experimento antes del destete. Transcurrido el periodo de tratamiento los animales fueron sacrificados y se recogieron muestras de suero y tejidos. Se obtuvieron muestras también de neonatos y adultos, diabéticos y controles, antes del inicio del tratamiento con insulina. En las muestras de suero se determinaron la insulinemia y los niveles de IGF-I y de IGF-II (sólo en neonatos), y se analizaron las IGFBPs mediante "Western ligand blot" y "Western immunoblot".

#### **3.5.1. Tratamiento con insulina de ratas diabéticas en periodo neonatal.**

##### **3.5.1.1. Peso, glucemia e insulinemia.**

La tabla 3.15. recoge los resultados del peso corporal, la glucemia y la insulinemia de las ratas neonatales de este experimento, tanto a 17 días (inicio del tratamiento) como a 21 días (final del tratamiento). En la figura 3.28. se presentan en forma de gráfico estos resultados a 21 días, junto con las determinaciones de IGF-I y II en suero.

Al tercer día de la administración de la STZ (17 días) no se encontraron diferencias significativas en el peso corporal entre los animales diabéticos y sus controles; a 21 días, en cambio, las ratas diabéticas presentaron un peso significativamente inferior (un 19,0%) al de sus controles mientras que el de las diabéticas tratadas con insulina no difirió significativamente.

La glucemia de las ratas diabéticas se situó más de tres veces por encima de la que presentaron los controles, tanto a 17 como a 21 días; en el momento del sacrificio no se encontraron diferencias significativas entre la glucemia de las ratas diabéticas tratadas con insulina y la glucemia de las ratas control.

Finalmente, como era de esperar, la insulinemia de las ratas diabéticas al final del experimento fue significativamente más baja (aproximadamente la mitad) que la de sus controles. Esta diferencia no se aprecia aún al tercer día de la administración de la STZ. Por el contrario, los niveles de insulina en el suero de las ratas diabéticas tratadas de 21 días fueron significativamente más elevados (aproximadamente un 40% más) que los encontrados en sus controles.

#### **3.5.1.2. Niveles de IGF-I y II en suero.**

Los niveles de IGF-I en suero fueron significativamente más bajos en los animales diabéticos que en los controles tanto a 17 como a 21 días (Tabla 3.15.); en las ratas diabéticas tratadas con insulina se produjo a 21 días una recuperación en la concentración de este péptido en la circulación, ya que sus valores fueron comparables a los de sus controles (Fig. 3.28.).

Los niveles de IGF-II experimentaron un descenso significativo entre 17 y 21 días en los neonatos controles. El análisis estadístico no mostró diferencias significativas con respecto a los controles ni en las ratas diabéticas ni en las tratadas con insulina, en ninguno de los dos estadios estudiados (Tabla 3.15. y Fig. 3.28.).

#### **3.5.1.3. Análisis de las IGFBPs en suero mediante "Western ligand blot" y "Western immunoblot".**

Para el estudio de las IGFBPs circulantes se seleccionaron al azar cuatro muestras de cada población y se analizaron 2,5  $\mu$ l de suero de cada una de ellas en un mismo gel (Fig. 3.29.). En la misma membrana de nitrocelulosa se efectuaron sucesivamente el análisis mediante "Western ligand blot" y mediante "Western immunoblot" con antisuero anti-bIGFBP-2.

La forma más abundante, tanto a 17 como a 21 días, pero especialmente a 17 días, corresponde al grupo de bandas de 27-30 kDa. La intensidad de estas bandas es claramente mayor en la población de ratas diabéticas, en tanto que el tratamiento con insulina provoca un marcado descenso en su densidad óptica. Se observa también una banda nítida a 24 kDa, y a 40-50 kDa un grupo de dos bandas muy tenues. El "immunoblot" revela una banda de 30 kDa, muy intensa, a 17 días, tanto en ratas controles como en diabéticas. A 21 días la intensidad de esta banda es claramente menor que a 17 días en las ratas control y en las diabéticas, pero sin diferencias claras entre ambas poblaciones. En las ratas tratadas con insulina se apreció un marcado descenso en la intensidad de esta banda con respecto a los controles.

#### **3.5.1.3.1. Cuantificación densitométrica.**

El resultado de la cuantificación de la autorradiografía de la figura 3.29. se recoge en la tabla 3.16. Los resultados obtenidos al final del experimento (21 días) se presentan también en forma de gráfico en la figura 3.31.A. La intensidad de cada banda se expresa en valor absoluto (unidades arbitrarias). La densidad óptica de las bandas entre 27 y 30 kDa se considera conjuntamente, ya que no fue posible resolver las bandas individuales al cuantificar la autorradiografía.

Las alteraciones más notables se observan en las bandas de 27-30 kDa. Tanto en las ratas diabéticas como en sus controles se produce un descenso con la edad en la intensidad de esta banda, que a ambas edades fue más alta en las diabéticas. El tratamiento con insulina provocó un descenso en la intensidad de estas bandas, de modo que a 21 días ésta fue aproximadamente la mitad de la que presentaron los controles. En las ratas control las bandas de 40-50 kDa aumentaron ligeramente de intensidad entre 17 y 21 días; a 21 días esta banda presentó una intensidad significativamente menor en los animales diabéticos, sin que el tratamiento con insulina provocara una recuperación apreciable. No se observaron cambios en la banda de 24 kDa, ni con la edad ni con el estado hormonal. Por último, la IGFBP total refleja los cambios que se producen en las bandas de 27-30 kDa, que son las más abundantes.

#### **3.5.2. Tratamiento con insulina de ratas adultas.**

##### **3.5.2.1. Peso, glucemia e insulinemia.**

La tabla 3.17. recoge los resultados del peso corporal, la glucemia y la insulinemia de las ratas adultas de este experimento, tanto al inicio del tratamiento (día 3 del experimento) como al final (día 7 del experimento y, por tanto, día 5 de tratamiento). Los resultados obtenidos al final del experimento, junto con las determinaciones de IGF-I en suero, se presentan también en forma de gráfico en la figura 3.28.

**Tabla 3.15.** *Peso, glucemia, insulinemia y concentración de IGF-I e IGF-II en suero de ratas diabéticas, controles y diabéticas tratadas con insulina durante 5 días, en periodo neonatal.*

		Peso (g)	Glucemia (mg/100 ml)	Insulinemia (ng/ml)	IGF-I (ng/ml)	IGF-II (ng/ml)
17 días	Diabéticas	32,1 ± 3,1	363,0 ± 55,4 <sup>a</sup>	1,37 ± 0,27	44,8 ± 22,3 <sup>a,b</sup>	333,1 ± 55,4
	Controles	33,3 ± 1,2 <sup>b</sup>	114,2 ± 4,5	1,83 ± 0,33 <sup>b</sup>	103,2 ± 19,4 <sup>b</sup>	325,4 ± 51,1 <sup>b</sup>
21 días	Diabéticas	34,9 ± 1,7 <sup>a</sup>	439,3 ± 33,2 <sup>a</sup>	1,31 ± 0,30 <sup>a</sup>	98,4 ± 49,9 <sup>a</sup>	313,3 ± 61,1
	Controles	43,1 ± 1,7	119,3 ± 3,8	2,80 ± 0,28	211,0 ± 41,6	251,1 ± 30,9
	Diabéticas + insulina	47,8 ± 3,1 <sup>c,d</sup>	84,2 ± 41,2 <sup>c,d</sup>	4,46 ± 0,85 <sup>a,c,d</sup>	230,1 ± 39,5 <sup>c,d</sup>	222,5 ± 35,7 <sup>c,d</sup>

Media ± DE de 5 a 8 animales.

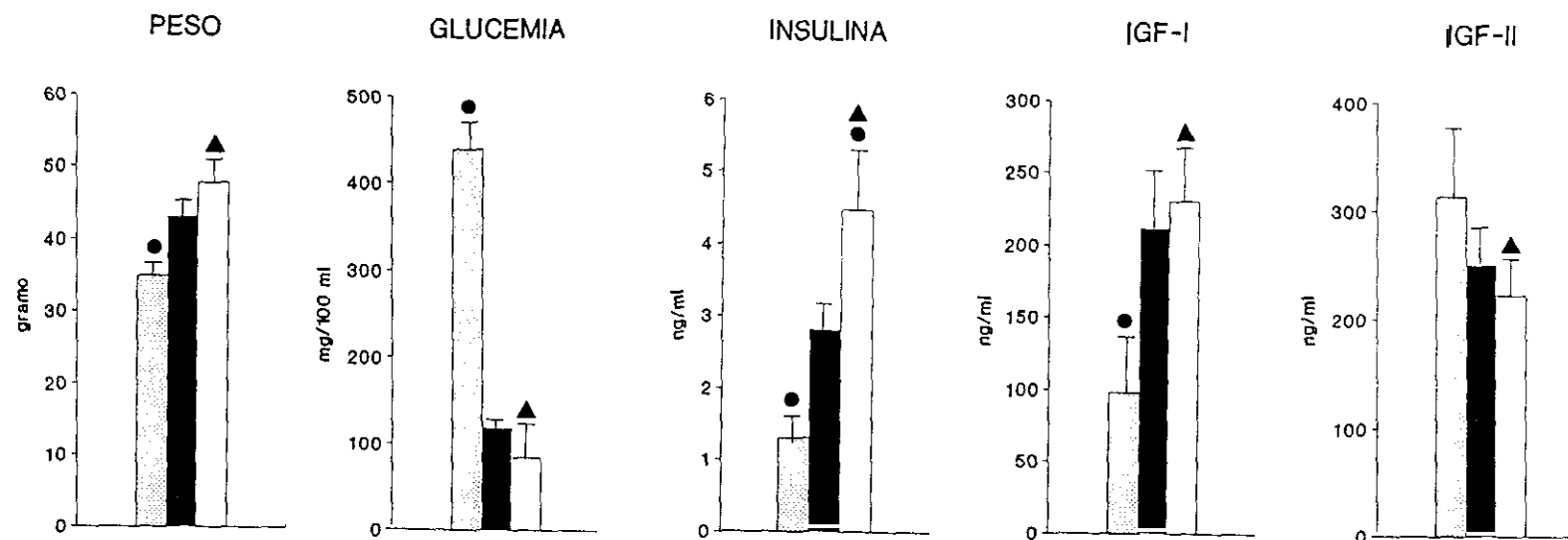
<sup>a</sup> Significación estadística con respecto al grupo control.

<sup>b</sup> Significación estadística con respecto al grupo de edad inmediatamente superior.

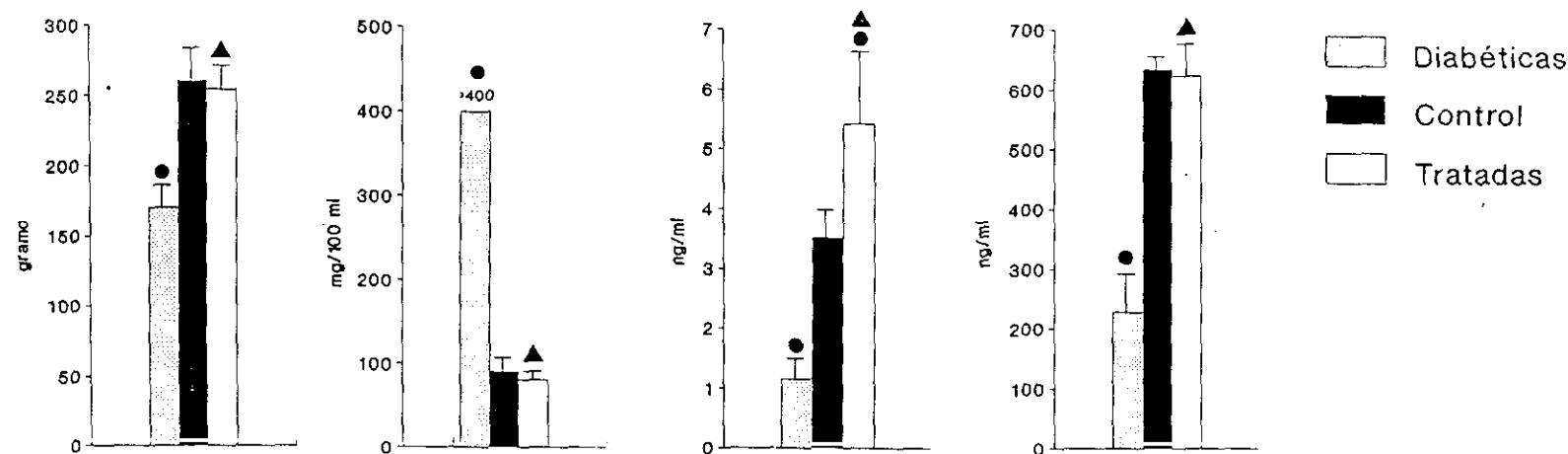
<sup>c</sup> Significación estadística con respecto a la población de ratas diabéticas de 17 días.

<sup>d</sup> Significación estadística con respecto a la población de ratas diabéticas de 21 días.

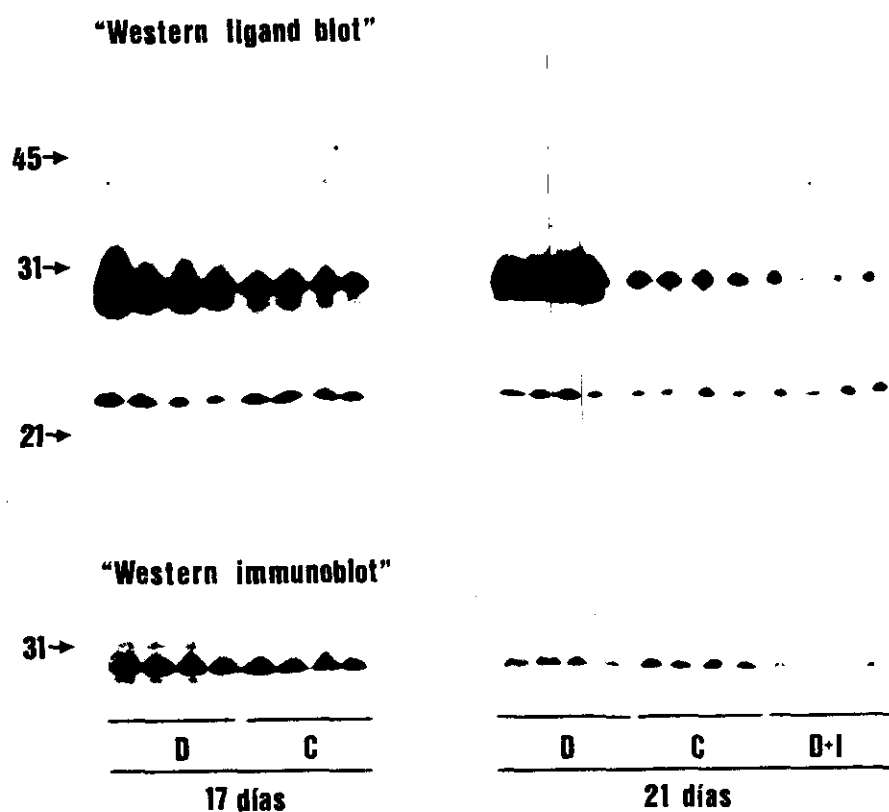
## NEONATOS



## ADULTOS



**Figura 3.28.** *Peso corporal, glucemia, insulinemia y concentración de IGF-I y II en suero de ratas diabéticas, controles alimentadas ad libitum y diabéticas tratadas con insulina durante 6 días en periodo neonatal y adulto. Media  $\pm$  DE de 5 - 6 animales. ● Significación estadística con respecto al grupo control. ▲ Significación estadística con respecto al grupo de ratas diabéticas.*



**Figura 3.29.** Análisis comparativo mediante "Western ligand blot" y "Western immunoblot" de las IGFbps del suero de ratas diabéticas (D), controles alimentadas ad libitum (C) y diabéticas tratadas con insulina durante 5 días (D+I) en periodo neonatal. Se analizaron cuatro muestras de cada población, tanto al inicio (17 días) como al final (21 días) del tratamiento. La cantidad de suero analizada fue de 2,5  $\mu$ l. Para el "ligand blot" las membranas fueron incubadas con  $2,5 \times 10^6$  cpm de  $^{125}$ I-IGF-II; el tiempo de exposición fue de 48 horas. Para el "immunoblot" se empleó antisuero anti-bGFBP-2. A la izquierda, patrones de pesos moleculares (en kDa).



**Tabla 3.16.** Cuantificación densitométrica de la autorradiografía de la figura 3.29. (IGFBPs en suero neonatal).

		Densidad óptica (unidades arbitrarias)			
		40-50 kDa	27-30 kDa	24 kDa	Total
<b>17 días</b>	Diabéticas	181,4 ± 103,0	3260,0 ± 1805,0	260,0 ± 142,8	3701,4 ± 2018,8
	Controles	232,3 ± 73,7 <sup>b</sup>	2073,5 ± 913,8 <sup>b</sup>	316,3 ± 56,5	2622,1 ± 999,0 <sup>b</sup>
<b>21 días</b>	Diabéticas	158,0 ± 104,7 <sup>a</sup>	2363,7 ± 394,9 <sup>a</sup>	198,1 ± 70,9	2719,7 ± 321,2 <sup>a</sup>
	Controles	388,9 ± 51,6	916,2 ± 111,1	175,5 ± 62,3	1480,6 ± 78,5
	Diabéticas + insulina	210,1 ± 48,5 <sup>a</sup>	445,6 ± 103,7 <sup>a,c,d</sup>	163,8 ± 29,0	819,5 ± 131,9 <sup>a,c,d</sup>

Media ± DE.

<sup>a</sup> Significación estadística con respecto al grupo control.

<sup>b</sup> Significación estadística con respecto al grupo de edad inmediatamente superior.

<sup>c</sup> Significación estadística con respecto a la población de ratas diabéticas de 17 días.

<sup>d</sup> Significación estadística con respecto a la población de ratas diabéticas de 21 días.

Los cambios observados en estos parámetros fueron muy similares a los ya comentados para las ratas diabéticas en etapa neonatal. Tanto el día 3 como el día 7 las ratas diabéticas presentaron un peso inferior al de sus controles (21,4% y 34,6% respectivamente). El peso de las diabéticas tratadas con insulina fue similar, al final del tratamiento, al de las controles de su misma edad.

La glucemia de las ratas diabéticas se situó en muchos casos por encima del límite de detección del autoanalizador, tanto el día 3 como el 7, razón por la cual en la tabla y en la gráfica se ha registrado como >400 mg/100 ml. En el momento del sacrificio la glucemia de las ratas diabéticas tratadas con insulina fue similar a la de sus controles.

Por último, la insulinemia de las ratas diabéticas fue inferior (cerca de un 70%) a la de las controles tanto el día 3 como el día 7. Por el contrario, los niveles de insulina en el suero de las ratas diabéticas tratadas con esta hormona fueron significativamente más elevados (aproximadamente un 35% más) que los hallados en sus controles.

#### **3.5.2.2. Niveles de IGF-I en suero.**

Análogamente a lo descrito en los neonatos, los niveles de IGF-I en suero fueron más bajos en los animales diabéticos que en los controles tanto el día 3 (28% aproximadamente) como, sobre todo, el día 7 (64% aproximadamente) (Tabla 3.17.); en las ratas diabéticas tratadas con insulina se produjo el día 7 una recuperación en la concentración de este péptido en la circulación, ya que sus valores fueron comparables a los de sus controles (Fig. 3.28.).

#### **3.5.2.3. Análisis de las IGFBPs en suero mediante "Western ligand blot" y "Western immunoblot".**

Para el análisis de las IGFBPs del suero se cargaron en un mismo gel 2,5 µl de suero de cuatro muestras, escogidas al azar, de cada una de las poblaciones de este estudio (Fig. 3.30.). En la misma membrana de nitrocelulosa se efectuaron sucesivamente el análisis mediante "Western ligand blot" y mediante "Western immunoblot" con antisuero anti-bIGFBP-2. A fin de obtener una señal clara en la prueba de "immunoblot" fue necesario prolongar el tiempo de revelado de la membrana.

En la autorradiografía se obtuvo, en las ratas control, el patrón de bandas característico de la rata adulta, ya descrito en 3.4.2.3., donde la forma predominante es el grupo de bandas de 40-50 kDa, seguida de un grupo de dos bandas intensas de 28 y 30 kDa; se observan también dos bandas tenues de 24 y 20 kDa. En los animales diabéticos se observó un descenso, con respecto a los controles, en la intensidad de todas las bandas,

descenso que fue ligero el día 3 y muy evidente el día 7, y que se recupera claramente en los animales tratados con insulina.

El "immunoblot" reveló una banda de 30 kDa de similar intensidad en las ratas diabéticas y controles el día 3, pero más intensa en las diabéticas el día 7, en que esta banda es muy tenue tanto en las controles como, sobre todo, en las que recibieron insulina.

#### **3.5.2.3.1. Cuantificación densitométrica.**

El resultado de la cuantificación de la autorradiografía de la figura 3.30. se recoge en la tabla 3.18. Los resultados obtenidos al final del experimento (día 7) se presentan también en forma de gráfico en la figura 3.31.B. La intensidad de cada banda se expresa en valor absoluto (unidades arbitrarias).

En las ratas control, tanto el día 3 como el día 7, la mayor parte de la IGFBP detectada por "Western ligand blot" (aproximadamente el 60%) está constituida por el grupo de bandas de 40-50 kDa. Las bandas de 28 y 30 kDa suponen, en conjunto, en torno al 30%, y el resto está constituido por las bandas de 24 y 20 kDa. Tanto el día 3 como el día 7, pero en mayor cuantía el día 7, se observó, en las ratas diabéticas, un descenso en la intensidad de todas las bandas, que fue más marcado en las bandas de 40-50 kDa (76,3% el día 7). El tratamiento con insulina provocó en estas ratas una clara recuperación en todas las formas de IGFBPs detectadas por ligand blot, de modo que no hubo diferencias significativas en la intensidad de las distintas bandas entre las ratas controles y las tratadas con insulina al final del experimento. Una excepción es la banda de 24 kDa, relativamente poco importante, por otro lado, en la que no se apreció esta recuperación.

#### **3.5.2.4. Estudio de regresión lineal y correlación.**

Las tablas 3.19. y 3.20. resumen los resultados del análisis de regresión de los parámetros estudiados en los experimentos de tratamiento con insulina que se acaban de describir. Los resultados de la tabla 3.19. corresponden al estudio en periodo neonatal y los de la tabla 3.20. corresponden al estudio en periodo adulto. Para este análisis se reunieron, en ambos casos, los datos obtenidos en las tres poblaciones al final del experimento.

La correlación entre IGF-I y el peso corporal fue positiva en neonatos y en adultos, con un  $r$  (0,91) más alto en estos últimos, en tanto que, en ambos experimentos, IGF-I se correlacionó negativamente con la glucemia (con  $r = -0,97$  en las ratas adultas y  $r = -0,76$  en los neonatos). También fue alto entre IGF-I y las distintas formas de IGFBPs (a excepción de la banda de 30 kDa) en las ratas adultas, con  $r$  entre 0,61 y 0,90. En los neonatos sólo se halló correlación, negativa, con las bandas de 27-30 kDa). La correlación

entre IGF-I y la insulinemia fue similar en adultos y en neonatos ( $r = 0,82$  y  $r = 0,71$  respectivamente).

En los neonatos se observó una correlación negativa entre IGF-II y el peso y la insulinemia, y positiva entre IGF-II y la glucemia.

El comportamiento de las bandas de IGFBP de 27-30 kDa frente al peso corporal, la glucemia y la insulinemia en rata neonatal fue opuesto al observado en adulto con las bandas de 28 y 30 kDa. Se observó en los neonatos correlación positiva con la glucemia, y negativa con la insulinemia y el peso corporal ( $p < 0,001$  en los tres casos). En los adultos las correlaciones fueron más moderadas y, como se ha dicho, de signo contrario a las del neonato.

Encontramos, por último, una buena correlación (con  $r$  en torno a  $-0,9$ ) entre el peso corporal y la glucemia en ambos experimentos. Sólo en los neonatos hubo correlación entre el peso corporal y la insulinemia ( $r = 0,92$ ;  $p < 0,001$ ).

### **3.5.3. Resumen de los resultados obtenidos en los experimentos de tratamiento con insulina.**

El tratamiento de los animales diabéticos (tanto neonatos como adultos) con insulina provocó una recuperación del peso corporal y de los niveles de IGF-I que presentaban los animales controles, junto con una normalización de la glucemia. A ambas edades la insulinemia al final del tratamiento estaba más elevada en las ratas tratadas que en las controles.

En cuanto a las IGFBPs del suero determinadas por "Western ligand blot", en los adultos tratados con insulina se produce una recuperación en las bandas más relevantes, que estaban disminuidas por efecto de la diabetes. En los neonatos el efecto más marcado del tratamiento se dejó ver en las bandas de 27-30 kDa (que estaban elevadas como consecuencia de la diabetes), con una marcada reducción, por debajo incluso de los controles. A ambas edades el tratamiento con insulina provocó un descenso en la intensidad de la banda de IGFBP-2 detectada por "Western immunoblot".

**Tabla 3.17.** *Peso, glucemia, insulinemia y concentración de IGF-I en suero de ratas diabéticas, controles y diabéticas tratadas con insulina durante 5 días, en periodo adulto.*

		<b>Peso</b> (g)	<b>Glucemia</b> (mg/100 ml)	<b>Insulinemia</b> (ng/ml)	<b>IGF-I</b> (ng/ml)
<b>Día 3</b>	Diabéticas	186,2 ± 26,5 <sup>a</sup>	> 400 <sup>a</sup>	1,07 ± 0,34 <sup>a</sup>	399,8 ± 122,4 <sup>a,b</sup>
	Controles	236,8 ± 21,8	95,4 ± 7,2	3,40 ± 0,75	553,0 ± 79,8
<b>Día 7</b>	Diabéticas	170,6 ± 15,7 <sup>a</sup>	> 400 <sup>a</sup>	1,16 ± 0,33 <sup>a</sup>	228,1 ± 55,9 <sup>a</sup>
	Controles	260,7 ± 20,4	91,0 ± 11,3	3,53 ± 0,40	634,8 ± 23,3
	Diabéticas + insulina	254,8 ± 15,5 <sup>c,d</sup>	80,8 ± 10,1 <sup>c,d</sup>	5,42 ± 1,20 <sup>a,c,d</sup>	624,1 ± 57,9 <sup>c,d</sup>

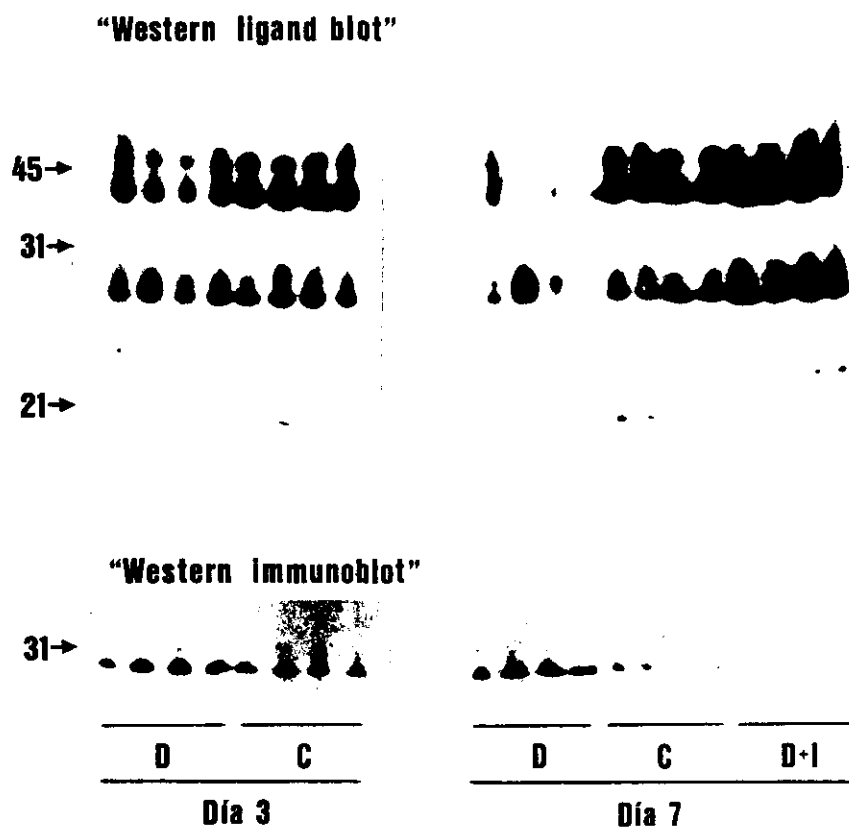
Media ± DE de 5 a 6 animales.

<sup>a</sup> Significación estadística con respecto al grupo control.

<sup>b</sup> Significación estadística con respecto al grupo de edad inmediatamente superior.

<sup>c</sup> Significación estadística con respecto a la población de ratas diabéticas del día 3.

<sup>d</sup> Significación estadística con respecto a la población de ratas diabéticas del día 7.



**Figura 3.30.** Análisis comparativo mediante "Western ligand blot" y "Western immunoblot" de las IGFBPs del suero de ratas diabéticas (D), controles alimentadas ad libitum (C) y diabéticas tratadas con insulina durante 5 días (D+I) en periodo adulto. Se analizaron cuatro muestras de cada población, tanto al inicio (día 3) como al final (día 7) del tratamiento. La cantidad de suero analizada fue de 2,5  $\mu$ l. Para el "ligand blot" las membranas fueron incubadas con  $2,5 \times 10^6$  cpm de  $^{125}$ I-IGF-II; el tiempo de exposición fue de 90 horas. Para el "immunoblot" se empleó antisuero anti-bGFBP-2. A la izquierda, patrones de pesos moleculares (en kDa).

**Tabla 3.18.** Cuantificación densitométrica de la autorradiografía de la figura 3.30. (IGFBPs en suero adulto).

		Densidad óptica (unidades arbitrarias)					
		40-50 kDa	30 kDa	28 kDa	24 kDa	20 kDa	Total
<b>Día 3</b>	Diabéticas	1359,6 ± 527,3 <sup>a</sup>	450,8 ± 129,9	559,2 ± 165,0	92,2 ± 34,6 <sup>a</sup>	55,1 ± 50,1 <sup>a</sup>	2517,4 ± 753,8 <sup>a</sup>
	Controles	2813,0 ± 314,5	566,9 ± 217,6	966,1 ± 251,7	219,1 ± 41,1	259,0 ± 75,6	4824,0 ± 577,5
<b>Día 7</b>	Diabéticas	825,7 ± 448,6 <sup>a</sup>	431,0 ± 66,2	360,8 ± 58,1 <sup>a</sup>	104,4 ± 34,3 <sup>a</sup>	19,4 ± 11,7 <sup>a</sup>	2095,7 ± 708,3 <sup>a</sup>
	Controles	3485,0 ± 237,3	764,5 ± 323,9	957,2 ± 315,8	196,9 ± 10,3	232,7 ± 59,7	5636,3 ± 387,9
	Diabéticas + insulina	3466,3 ± 861,4 <sup>c,d</sup>	1079,8 ± 185,9 <sup>c,d</sup>	1370,1 ± 333,2 <sup>c,d</sup>	115,2 ± 36,3 <sup>a</sup>	160,0 ± 33,2 <sup>c,d</sup>	6191,1 ± 1544,5 <sup>c,d</sup>

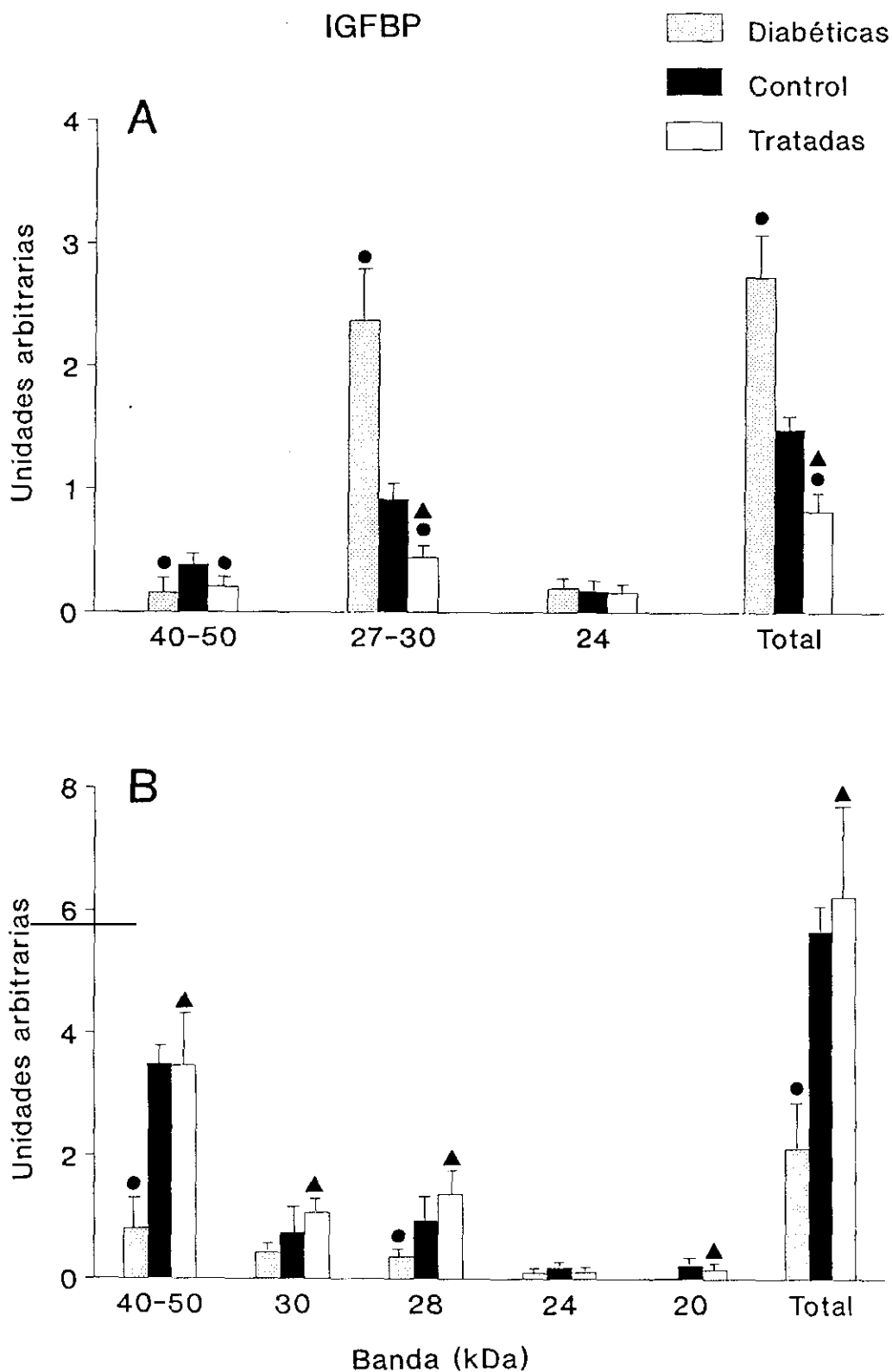
Media ± DE.

<sup>a</sup> Significación estadística con respecto al grupo control.

<sup>b</sup> Significación estadística con respecto al día 7.

<sup>c</sup> Significación estadística con respecto a la población de ratas diabéticas del día 3.

<sup>d</sup> Significación estadística con respecto a la población de ratas diabéticas del día 7.



**Figura 3.31.** Cuantificación densitométrica de las autorradiografías de las figuras 3.29. (IGFBPs en suero neonatal, A) y 3.30. (IGFBPs en suero adulto, B). Se muestra la parte correspondiente al final del periodo de tratamiento. El resultado se expresa como unidades arbitrarias. Media  $\pm$  DE. ● Significación estadística con respecto al grupo control. ▲ Significación estadística con respecto al grupo de ratas diabéticas.



**Tabla 3.19.** Análisis de regresión lineal y correlación de diversos parámetros de las ratas diabéticas, controles y diabéticas tratadas con insulina durante 5 días, en periodo neonatal. Este análisis se efectuó reuniendo los datos de las tres poblaciones al final del experimento.

		Ecuación de la recta	r	p
<b>IGF-I</b> frente a	Peso corporal	$y = -84,37 + 6,33x$	0,7704	$p < 0,001$
	Glucemia	$y = 224,77 - 0,22x$	-0,7629	$p < 0,001$
	Insulinemia	$y = 114,71 + 23,63x$	0,7091	$p < 0,01$
	IGFBP 40-50 kDa	$y = 147,65 + 0,14x$	0,4380	NS
	IGFBP 27-30 kDa	$y = 220,48 - 0,03x$	-0,6633	$p < 0,05$
	IGFBP 24 kDa	$y = 270,16 - 0,51x$	-0,5652	NS
<b>IGF-II</b> frente a	Peso corporal	$y = 504,42 - 5,95x$	-0,6109	$p < 0,05$
	Glucemia	$y = 210,14 + 0,22x$	0,6286	$p < 0,05$
	Insulinemia	$y = 310,62 - 20,65x$	-0,5770	$p < 0,05$
	IGFBP 40-50 kDa	$y = 280,15 - 0,14x$	-0,3545	NS
	IGFBP 27-30 kDa	$y = 207,03 + 0,03x$	0,5717	NS
	IGFBP 24 kDa	$y = 203,72 + 0,23x$	0,2453	NS
<b>IGFBP 27-30 kDa</b> frente a	Peso corporal	$y = 8068,28 - 163,16x$	-0,9584	$p < 0,001$
	Glucemia	$y = 202,05 + 4,89x$	0,9145	$p < 0,001$
	Insulinemia	$y = 3015,29 - 642,28x$	-0,8870	$p < 0,001$
<b>Peso corporal</b> frente a	Glucemia	$y = 48,34 - 0,03x$	-0,8608	$p < 0,001$
	Insulinemia	$y = 31,89 + 3,63x$	0,9204	$p < 0,001$
	IGFBP 40-50 kDa	$y = 38,88 + 0,01x$	0,3358	NS
	IGFBP 24 kDa	$y = 45,04 - 0,01x$	-0,1516	NS

**Tabla 3.20.** *Análisis de regresión lineal y correlación de diversos parámetros de las ratas diabéticas, controles y diabéticas tratadas con insulina durante 5 días, en periodo adulto. Este análisis se efectuó reuniendo los datos de las tres poblaciones al final del experimento.*

		Ecuación de la recta	r	p
<b>IGF-I</b> frente a	Peso corporal	$y = -416,08 + 4,00x$	0,9102	$p < 0,001$
	Glucemia	$y = 182,94 - 1,28x$	-0,9654	$p < 0,001$
	Insulinemia	$y = 210,96 + 86,75x$	0,8221	$p < 0,001$
	IGFBP 40-50 kDa	$y = 163,02 + 0,12x$	0,9041	$p < 0,001$
	IGFBP 30 kDa	$y = 254,44 + 0,32x$	0,5882	NS
	IGFBP 28 kDa	$y = 246,95 + 0,28x$	0,7257	$p < 0,05$
	IGFBP 24 kDa	$y = 161,99 + 2,33x$	0,6113	$p < 0,05$
	IGFBP 20 kDa	$y = 255,11 + 1,69x$	0,8625	$p < 0,001$
<b>IGFBP 28 kDa</b> frente a	Peso corporal	$y = -370,21 + 5,59x$	0,5670	NS
	Glucemia	$y = 1408,90 - 2,64x$	-0,7901	$p < 0,01$
	Insulinemia	$y = 237,20 + 199,08x$	0,7404	$p < 0,01$
<b>IGFBP 30 kDa</b> frente a	Peso corporal	$y = -255,64 + 4,44x$	0,6493	$p < 0,05$
	Glucemia	$y = 1069,04 - 1,60x$	-0,6878	$p < 0,05$
	Insulinemia	$y = 363,71 + 119,45x$	0,6392	$p < 0,05$
<b>Peso corporal</b> frente a	Glucemia	$y = 283,57 - 0,28x$	-0,9287	$p < 0,001$
	Insulinemia	$y = 153,70 + 18,29x$	0,4728	NS
	IGFBP 40-50 kDa	$y = 144,62 + 0,03x$	0,9235	$p < 0,001$
	IGFBP 24 kDa	$y = 143,08 + 0,63x$	0,6330	$p < 0,05$
	IGFBP 20 kDa	$y = 173,14 + 0,41x$	0,8205	$p < 0,01$

### **3.6. Realimentación y tratamiento con insulina de ratas adultas subnutridas y diabéticas**

La finalidad de este experimento fue estudiar la contribución relativa de la insulina y el estado nutricional en la regulación de la secreción de IGF-I. Para ello se emplearon ratas adultas (de un peso medio de 200 g) que habían sido subnutridas durante una semana, al término de la cual recibieron STZ por vía intraperitoneal. Tres días después (día 10 del experimento) un grupo de estas ratas subnutridas y diabéticas (población SD) fue tratado con insulina (población SD+I), y otro además de insulina recibió alimento *ad libitum* (población RD+I). El protocolo de este experimento se detalla en Material y Métodos (2.1.6.) y se resume en la figura 3.32. Los animales fueron sacrificados cinco días después (día 14). Se obtuvieron muestras también de ratas subnutridas (poblaciones S) y controles alimentadas *ad libitum* (poblaciones C) de los días 10 y 14. No pudieron analizarse muestras de ratas subnutridas diabéticas hasta el día 14, ya que no hubo supervivencia en esta población. En las muestras de suero obtenidas se determinó la insulinemia y los niveles de IGF-I y se analizaron las IGFBPs mediante "Western ligand blot" y "Western immunoblot".

#### **3.6.1. Evolución del peso corporal.**

En la figura 3.33. se muestra la evolución del peso corporal de las diferentes poblaciones de ratas a lo largo del periodo de estudio expresado como tanto por ciento de incremento con respecto al inicio del experimento (día 0), en que se asigna a este parámetro un valor de 100%.

Las ratas control (C) experimentaron a lo largo de los 14 días un incremento de peso progresivo y lineal; al final del experimento su peso era un 33,1% superior al que tenían al inicio. Las ratas subnutridas (S), por el contrario, experimentaron una pérdida de peso también progresiva pero más marcada durante la primera semana. Al final del experimento el peso de estas ratas había descendido aproximadamente un 20%.

La inyección de STZ el día 7 a las ratas subnutridas (SD) provocó una pérdida de peso suplementaria de un 11,7% con respecto a las ratas subnutridas del mismo estadio. El tratamiento con insulina de estas ratas subnutridas y diabéticas estabiliza la pérdida de peso, que tuvo lugar a un ritmo similar a la de los animales subnutridos no diabéticos. Al final del experimento estas ratas tratadas con insulina (SD+I) habían perdido un 32,7% de peso respecto al día 0.

Cuando las ratas subnutridas diabéticas fueron realimentadas y tratadas con insulina se produjo una recuperación de peso inmediata y marcada, que fue, el día 14, de un 30% aproximadamente con respecto a los mismos animales no realimentados. Esta población

de ratas (RD+I) presentó, al final del experimento, un peso sólo muy ligeramente inferior (96,3%) al que tenían el día 0.

### **3.6.2. Peso, glucemia e insulinemia.**

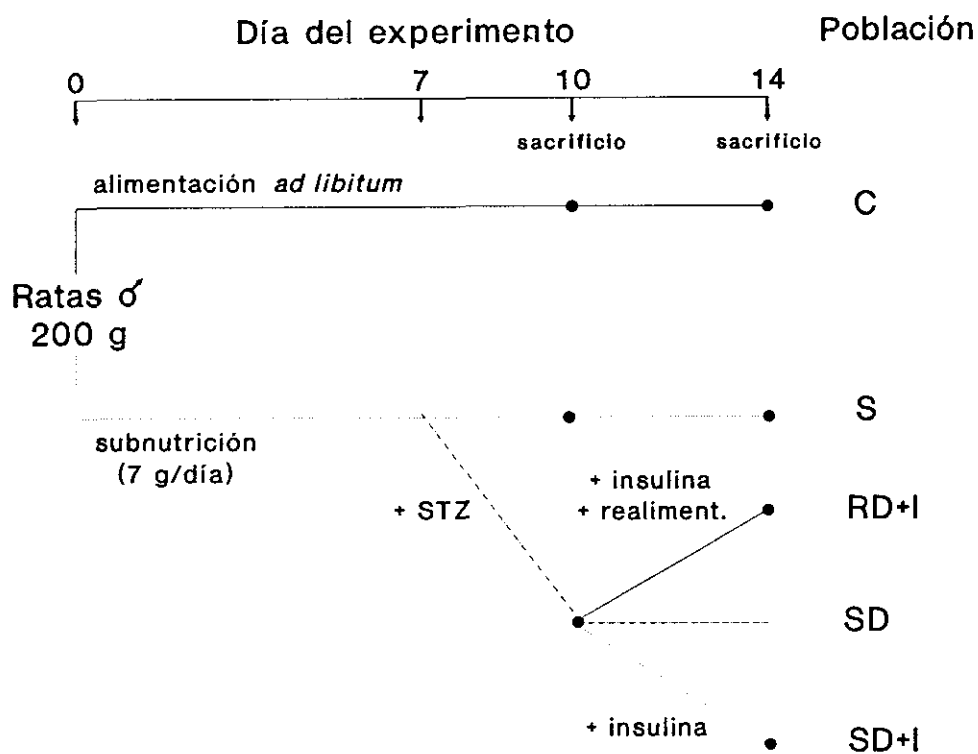
Los valores del peso, la glucemia y la insulinemia de los animales sacrificados los días 10 y 14 del experimento se recogen en la tabla 3.21. Los resultados obtenidos en el peso corporal reflejan los cambios ya comentados en el epígrafe anterior, por lo que no se hará hincapié en ellos.

La glucemia de las ratas subnutridas (S) fue inferior a la de sus controles (C), tanto el día 10 como el día 14; esta diferencia fue significativa sólo el día 14. Como era de esperar, los animales que recibieron STZ (SD) presentaron niveles de glucemia muy superiores (casi 3 veces) a los de sus controles del mismo estadio. En cuanto a los animales tratados con insulina, tanto realimentados (RD+I) como no (SD+I), los valores de este parámetro en el momento del sacrificio fueron significativamente inferiores a los de los animales controles del mismo estadio (aproximadamente 67 y 42 % respectivamente). Hay que tener en cuenta, sin embargo, que este dato no refleja fielmente la glucemia media a lo largo del día, ya que la insulina se administra exógenamente según la glucemia de los animales en el momento de la inyección.

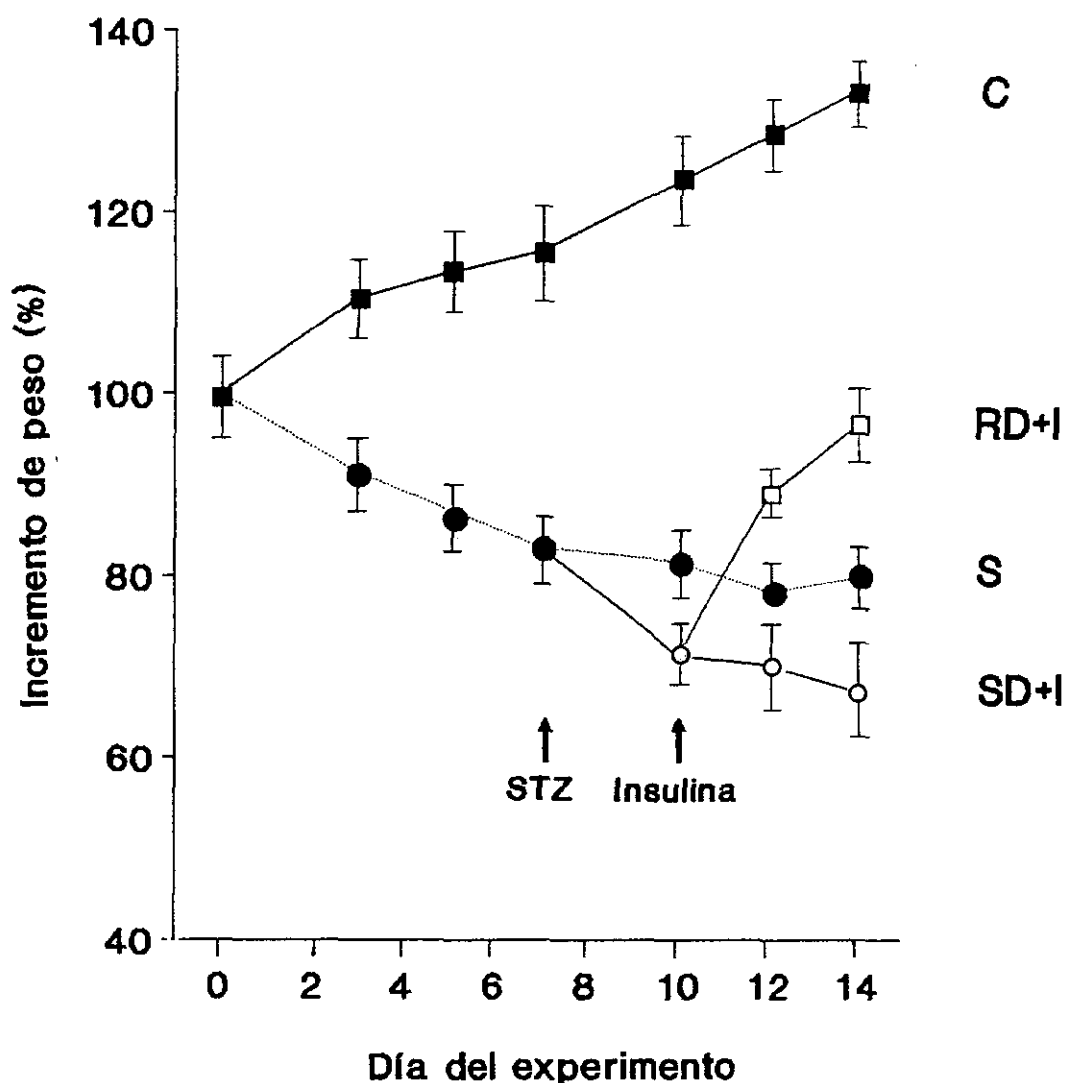
La insulinemia de los animales alimentados *ad libitum* (C) no experimentó cambio significativo alguno entre el día 10 y el día 14, manteniéndose en torno a los 3 ng/ml. Los animales subnutridos (S) presentaron una insulinemia inferior a la de sus controles en ambos estadios; esta diferencia fue significativa el día 14 del experimento, en que la glucemia de los animales subnutridas era aproximadamente 1/3 de la de sus controles. Los animales que recibieron STZ el día 7 presentaron a los tres días (SD) una marcada reducción (estadísticamente significativa) de su insulinemia, que fue de 0,86 ng/ml. Finalmente, la insulinemia de las ratas que recibieron tratamiento sustitutivo con insulina fue similar a la de los controles al final del experimento en los animales subnutridos (SD+I) y significativamente más elevada en los realimentados (RD+I).

### **3.6.3. Niveles de IGF-I en suero.**

Como muestra la figura 3.34., entre el día 10 y el día 14 del experimento no hay cambios significativos en los niveles de IGF-I en el suero de los animales controles. Los animales subnutridos (S) presentaron en ambos estadios niveles significativamente inferiores a los de sus controles; entre el día 10 y 14 se produjo además un descenso en la concentración sérica de este péptido, con valores aproximadamente la mitad y la tercera parte, respectivamente, de los que presentaron los controles (C) correspondientes.



**Figura 3.32.** *Diseño experimental del estudio de realimentación y tratamiento con insulina de ratas adultas subnutridas y diabéticas. Las abreviaturas de las distintas poblaciones son: C, ratas control alimentadas ad libitum; S, ratas subnutridas; SD, ratas subnutridas y diabéticas por STZ; SD+I, ratas subnutridas y diabéticas tratadas con insulina; RD+I, ratas subnutridas y diabéticas realimentadas y tratadas con insulina. Aunque se ha incluido en el gráfico, no hubo supervivencia de ratas SD hasta el día 14 del experimento.*



**Figura 3.33.** Evolución del peso corporal de las distintas poblaciones del estudio de realimentación y tratamiento con insulina de ratas adultas subnutridas y diabéticas. La variación del peso se expresa como tanto por ciento del peso al inicio del experimento (día 0), en que se asignó a este parámetro el valor de 100%. Las abreviaturas de la leyenda son como en la figura 3.32. Cada punto representa la media  $\pm$  DE de 6 animales. Hubo significación estadística entre las distintas poblaciones en todos los estadios.

**Tabla 3.21.** *Peso, glucemia y concentración de insulina en suero de ratas subnutridas (S), controles (C) y subnutridas diabéticas (SD) antes (día 10) y después (día 14) del tratamiento con insulina durante 5 días, con o sin realimentación (RD+I o SD+I respectivamente), en periodo adulto.*

		<b>Peso (g)</b>	<b>Glucemia (mg/100 ml)</b>	<b>Insulinemia (ng/ml)</b>
<b>Día 10</b>	Subnutridas (S)	159,5 ± 7,2 <sup>a</sup>	104,0 ± 20,3	2,62 ± 0,82
	Controles (C)	254,7 ± 22,1	123,6 ± 7,8	3,11 ± 0,92
	Subnutridas diabéticas (SD)	140,2 ± 7,1 <sup>a,c</sup>	289,8 ± 79,8 <sup>a,c</sup>	0,86 ± 0,19 <sup>a,c</sup>
<b>Día 14</b>	Subnutridas (S)	155,8 ± 5,0 <sup>a</sup>	78,5 ± 23,8 <sup>a</sup>	1,27 ± 0,17 <sup>a,b</sup>
	Controles (C)	270,3 ± 21,1 <sup>b</sup>	120,3 ± 4,8	3,26 ± 0,28
	Subnutr. diabéticas + insulina (SD+I)	138,3 ± 8,1 <sup>a,c</sup>	50,0 ± 19,9 <sup>a,b</sup>	3,06 ± 0,43 <sup>b,c</sup>
	Realim. diabéticas + insulina (RD+I)	210,2 ± 20,0 <sup>a,b,c,d</sup>	80,8 ± 33,2 <sup>a,b</sup>	4,91 ± 1,15 <sup>a,b,c,d</sup>

Media ± DE de 5 - 6 animales.

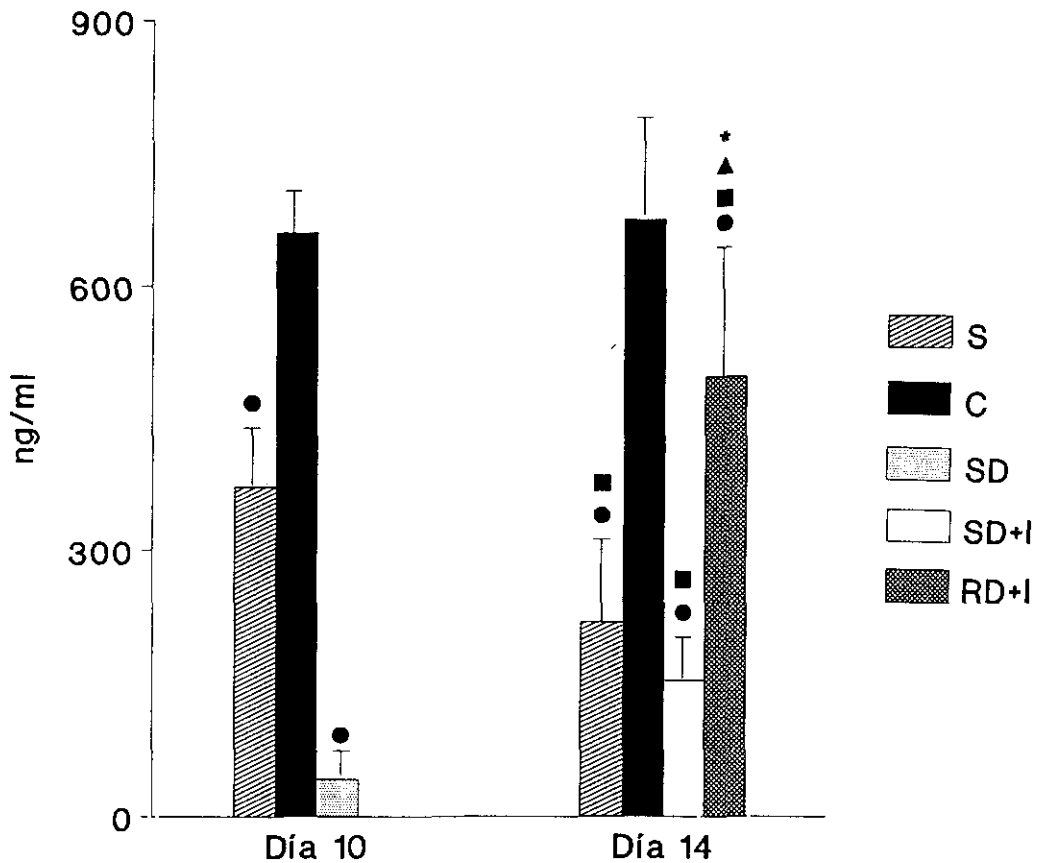
<sup>a</sup> Significación estadística con respecto al grupo C.

<sup>b</sup> Significación estadística con respecto la misma población (S, C o SD) el día 10.

<sup>c</sup> Significación estadística con respecto a la población de ratas S del mismo estadio.

<sup>d</sup> Significación estadística entre las poblaciones de ratas tratadas con insulina (SD+I y RD+I).

## IGF-I



**Figura 3.34.** Niveles de IGF-I en suero de las distintas poblaciones del estudio de realimentación y tratamiento con insulina de ratas adultas subnutridas y diabéticas. Las abreviaturas de la leyenda son como en la figura 3.32. Media  $\pm$  DE de 6 animales. ● Significación estadística con respecto al grupo control (C). ■ Significación estadística con respecto a la misma población (C, S o SD) el día 10. ▲ Significación estadística con respecto a la población de ratas subnutridas (S) del mismo estadio. \* Significación estadística entre las poblaciones de ratas tratadas con insulina (SD+I y RD+I).



Los animales subnutridos tratados con STZ mostraron, al tercer día de la inyección (SD), un descenso marcado de los niveles circulantes de IGF-I, que eran un 6,3% y un 11,1% de los que presentaban las ratas controles y subnutridas, respectivamente, del mismo estadio. El tratamiento con insulina de estos animales provocó, el día 14, una recuperación parcial de los niveles de IGF-I, que es escasa (unas 3,7 veces), pero significativa, en los animales en que se continuó la subnutrición (SD+I) y más marcada (unas 12 veces) en los animales realimentados (RD+I), en comparación con los animales subnutridos diabéticos el día 10. En ambos casos, sin embargo, la concentración de IGF-I circulante fue significativamente inferior a la de los animales control: aproximadamente la cuarta parte en las ratas subnutridas (SD+I) y las tres cuartas partes en las realimentadas (RD+I).

#### **3.6.4. Análisis de las IGFBPs en suero.**

##### **3.6.4.1. "Western ligand blot".**

Se analizaron las IGFBPs presentes en 2,5  $\mu$ l de suero de las ratas empleadas en este estudio, tanto el día 10 como el día 14. El resultado de este análisis se recoge en la figura 3.35. Se aprecia claramente el patrón característico del suero de rata adulta, con tres grupos de bandas, a 40-50 kDa (dos bandas claramente separadas), en torno a 30 kDa (dos bandas muy próximas de 30 y 28 kDa) y a 24 kDa.

Las alteraciones observadas se analizan mejor con los resultados de la cuantificación densitométrica que se recogen en la figura 3.36. En esta figura se han representado los valores obtenidos cuantificando por separado las diferentes bandas, a excepción del grupo de bandas de 40-50 kDa, que se cuantificó en conjunto. El complejo de 40-50 kDa es la forma más abundante en la rata control (C) (aproximadamente el 65% de la densidad óptica total), seguido del grupo de bandas en torno a 30 kDa (aproximadamente el 30%) y la banda de 24 kDa (aproximadamente el 3%). Entre el día 10 y el día 14 del experimento no se observaron cambios significativos en este patrón de bandas, a excepción de un ligero descenso, de escasa cuantía aunque significativo) de la intensidad de la banda de 24 kDa al final del experimento. La subnutrición (poblaciones S) provocó un descenso en la intensidad de todas las bandas, de una cuantía entre el 50 y el 85% aproximadamente; el efecto más marcado se observó sobre las bandas de 40-50 kDa y sobre la banda de 28 kDa. No hubo cambios significativos entre el día 10 y el día 14 en la intensidad de las diferentes bandas en la población de ratas subnutridas. No hubo diferencias significativas tampoco, el día 10, entre los animales subnutridos (S) y los que habían recibido STZ (SD). El tratamiento con insulina de los animales subnutridos diabéticos (SD+I) no produjo ningún cambio significativo con respecto a los animales subnutridos (no diabéticos) (S) en ninguna de las bandas al final del experimento. Finalmente, la realimentación, junto con el tratamiento con insulina (RD+I), se vio

acompañada de un incremento en la intensidad de todas las bandas, que fue estadísticamente significativo en todas ellas, a excepción de la de 30 kDa.

#### **3.6.4.2. Análisis comparativo mediante "Western ligand blot" y "Western immunoblot".**

La figura 3.37. muestra el resultado del análisis del equivalente de 2,5  $\mu$ l de suero de dos o tres muestras de cada una de las poblaciones de este experimento efectuado mediante "Western ligand blot" y mediante "Western immunoblot" con antisuero anti-bIGFBP-2. Ambos análisis se efectuaron sucesivamente en la misma membrana de nitrocelulosa. A fin de obtener una señal visible en la prueba de "immunoblot" fue necesario prolongar el tiempo de revelado de la membrana.

El resultado del análisis de "Western ligand blot" es esencialmente el descrito en el apartado anterior. El análisis de "Western immunoblot" mostró la presencia de una banda poco intensa de 30 kDa, apenas visible en las poblaciones de ratas control, tanto el día 10 como el día 14. La subnutrición provocó un ligero incremento en la intensidad de esta banda en ambos estadios del experimento, incremento que fue muy marcado en la población de ratas subnutridas diabéticas (SD). El tratamiento con insulina de las ratas subnutridas diabéticas (población SD+I) se tradujo en un descenso en la intensidad de la banda de IGFBP-2, mientras que el tratamiento con insulina, acompañado de realimentación (población RD+I) resultó en la desaparición de esta banda.

#### **3.6.5. Estudio de regresión lineal y correlación.**

La tabla 3.22. resume los resultados del análisis de regresión de los parámetros anteriormente descritos. Este análisis se ha efectuado reuniendo los resultados obtenidos en las distintas poblaciones al final del experimento.

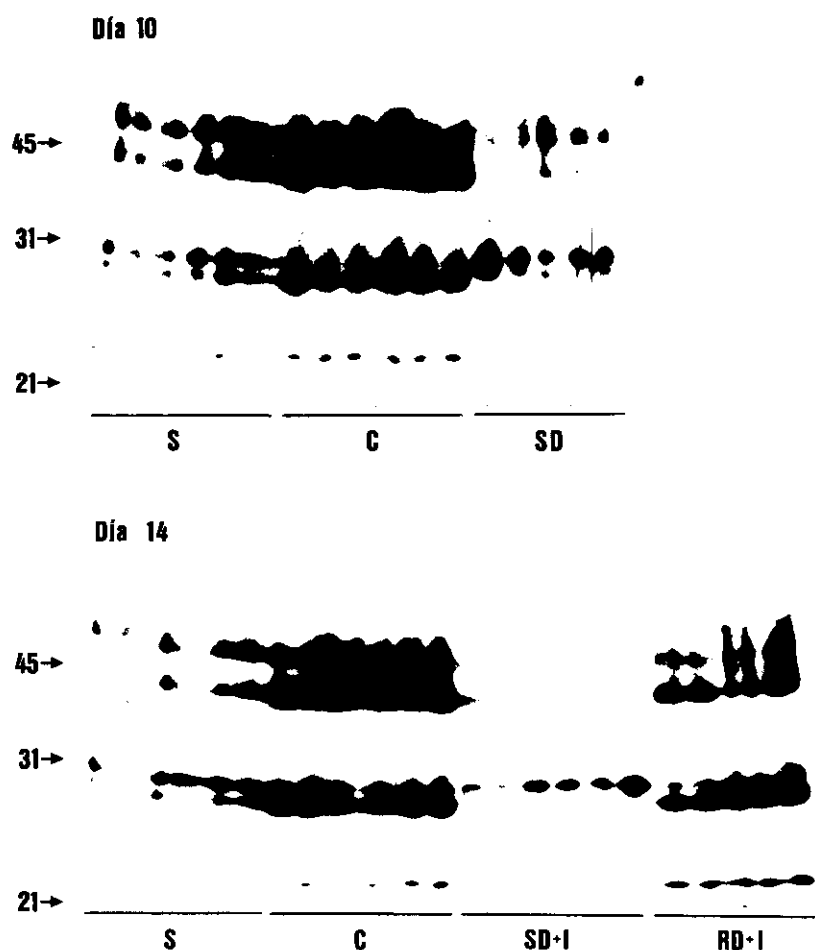
Se halló una alta correlación (con  $r$  entre 0,6 y 0,9) entre los niveles de IGF-I en suero y parámetros como el peso corporal, la glucemia y la intensidad de las distintas bandas de IGFBP. La correlación con la insulinemia, aunque significativa, fue más baja ( $r = 0,49$ ).

El peso corporal se correlacionó bien con todas las formas de IGFBPs, así como con la glucemia, pero no hubo significación estadística con la insulinemia. Finalmente, tanto la IGFBP de 28 kDa como la de 30 kDa se correlacionaron con la insulinemia ( $r$  aproximadamente 0,7 ambas), pero sólo la IGFBP de 30 kDa se correlacionó significativamente con la glucemia.

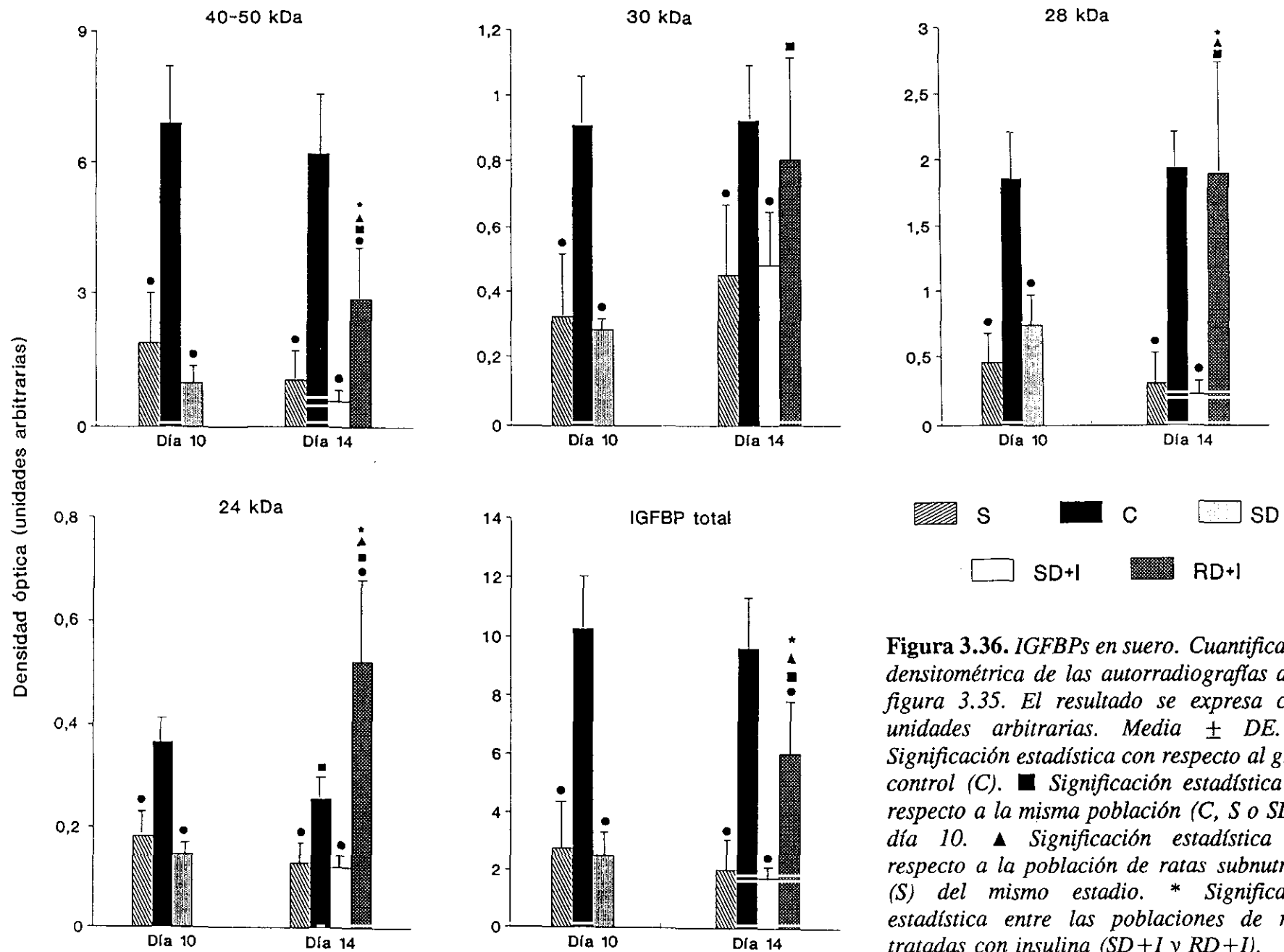
### **3.6.6. Resumen de los resultados obtenidos en el experimento de realimentación y tratamiento con insulina.**

El tratamiento de los animales subnutridos diabéticos con insulina no provocó ninguna alteración en los niveles de IGF-I ni modificó el peso corporal, a pesar de que los niveles de insulina fueron similares a los de los animales control del mismo estadio. En cambio, cuando el tratamiento con insulina se acompañó de realimentación se produjo una clara ganancia de peso y una elevación de los niveles de IGF-I (sin alcanzarse, por otro lado, los niveles de las ratas control); en estas ratas los niveles de insulina fueron más altos que los de las ratas control.

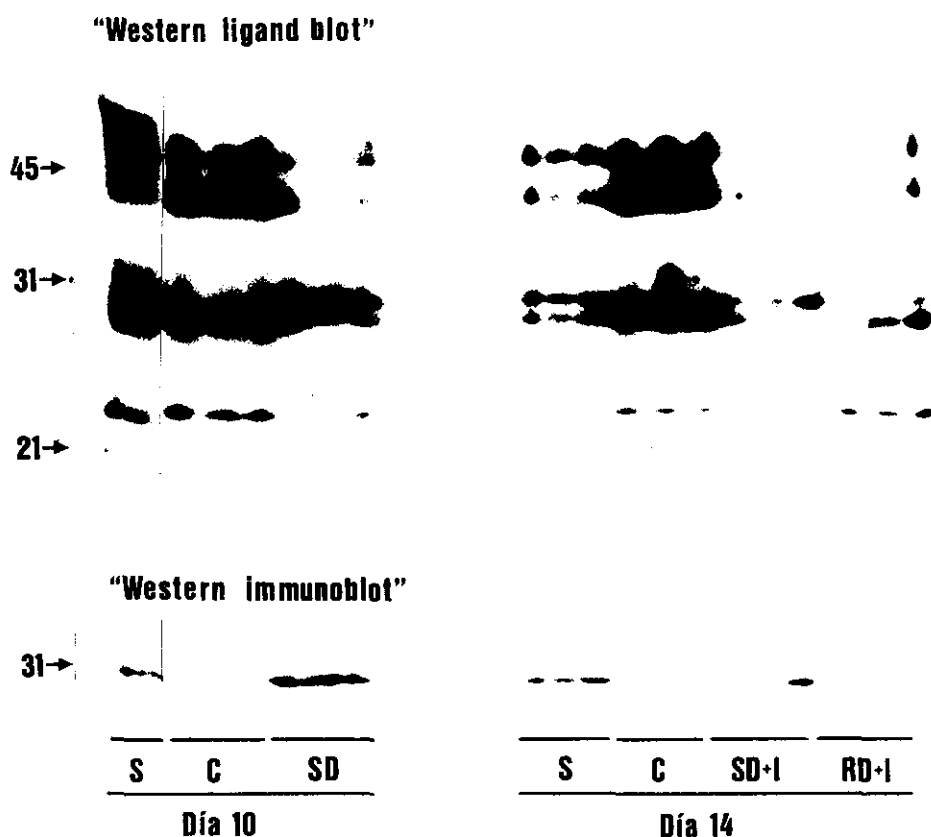
En las IGFBPs se produjeron cambios similares a los descritos para IGF-I: no hubo alteraciones en las ratas que sólo recibieron tratamiento con insulina, mientras que en las que además fueron realimentadas hubo una recuperación parcial en las bandas de IGFBP de 40-50 kDa y total en las de 30 y 28 kDa; la banda de 24 kDa presentó mayor intensidad que la observada en las ratas control. Finalmente, el tratamiento con insulina parece provocar un descenso en los niveles de IGFBP-2, más marcado si se acompaña de realimentación.



**Figura 3.35.** Análisis mediante "Western ligand blot" de las IGFBPs del suero de las ratas de las distintas poblaciones del estudio de realimentación y tratamiento con insulina de ratas adultas subnutridas y diabéticas. Se analizaron 5 - 6 muestras de cada población, tanto el día 10 como el día 14 del experimento. Las abreviaturas de cada población son como en la figura 3.32. La cantidad de suero analizada fue de 2,5  $\mu$ l. Las membranas fueron incubadas con  $2,5 \times 10^6$  cpm de  $^{125}$ I-IGF-II; el tiempo de exposición fue de 48 horas. A la izquierda, patrones de pesos moleculares (en kDa).



**Figura 3.36. IGFBPs en suero.** Cuantificación densitométrica de las autorradiografías de la figura 3.35. El resultado se expresa como unidades arbitrarias. Media  $\pm$  DE. ● Significación estadística con respecto al grupo control (C). ■ Significación estadística con respecto a la misma población (C, S o SD) el día 10. ▲ Significación estadística con respecto a la población de ratas subnutridas (S) del mismo estadio. \* Significación estadística entre las poblaciones de ratas tratadas con insulina (SD+I y RD+I).



**Figura 3.37.** Análisis comparativo mediante "Western ligand blot" y "Western immunoblot" de las IGFBPs del suero de las ratas de las distintas poblaciones del estudio de realimentación y tratamiento con insulina de ratas adultas subnutridas y diabéticas. Se analizaron 2 - 3 muestras de cada población, tanto el día 10 como el día 14 del experimento. Las abreviaturas de cada población son como en la figura 3.32. La cantidad de suero analizada fue de 2,5  $\mu$ l. Para el "ligand blot" las membranas fueron incubadas con  $2,5 \times 10^6$  cpm de  $^{125}$ I-IGF-II; el tiempo de exposición fue de 48 horas. Para el "immunoblot" se empleó antisuero anti-bGFBP-2. A la izquierda, patrones de pesos moleculares (en kDa).

**Tabla 3.22.** *Análisis de regresión lineal y correlación de diversos parámetros de las ratas del experimento de realimentación y tratamiento con insulina. Este análisis se efectuó reuniendo los datos de las cuatro poblaciones al final del experimento.*

		Ecuación de la recta	r	p
<b>IGF-I</b> frente a	Peso corporal	$y = -237,37 + 3,26x$	0,8739	$p < 0,001$
	Glucemia	$y = -57,06 + 5,21x$	0,7363	$p < 0,001$
	Insulinemia	$y = 153,05 + 81,08x$	0,4865	$p < 0,05$
	IGFBP 40-50 kDa	$y = 181,38 + 0,08x$	0,8136	$p < 0,001$
	IGFBP 30 kDa	$y = 38,63 + 0,55x$	0,6750	$p < 0,001$
	IGFBP 28 kDa	$y = 162,75 + 0,22x$	0,8389	$p < 0,001$
	IGFBP 24 kDa	$y = 176,01 + 0,80x$	0,6213	$p < 0,01$
<b>IGFBP 28 kDa</b> frente a	Peso corporal	$y = -1710,61 + 14,17x$	0,8401	$p < 0,001$
	Glucemia	$y = -2027,85 + 57,22x$	0,7510	$p < 0,001$
	Insulinemia	$y = -303,21 + 478,61x$	0,6862	$p < 0,001$
<b>IGFBP 30 kDa</b> frente a	Peso corporal	$y = 143,38 + 2,87x$	0,4729	$p < 0,05$
	Glucemia	$y = 511,05 + 2,44x$	0,2460	NS
	Insulinemia	$y = 368,08 + 546,13x$	0,6511	$p < 0,01$
<b>Peso corporal</b> frente a	Glucemia	$y = 83,52 + 1,31x$	0,7651	$p < 0,001$
	Insulinemia	$y = 149,85 + 15,21x$	0,3997	NS
	IGFBP 40-50 kDa	$y = 141,15 + 0,02x$	0,9118	$p < 0,001$
	IGFBP 24 kDa	$y = 157,48 + 0,14x$	0,4811	$p < 0,05$

#### **4. DISCUSSION**



## **4. DISCUSION**

### **4.1. Evaluación de distintos métodos de separación de las IGFBPs del suero**

La interferencia de las IGFBPs en la determinación de los niveles de IGF tiene efectos complejos y difíciles de predecir. Así, la unión del radioligando a las proteínas ligadoras puede dar lugar, en la mayoría de los casos, a un falso incremento en la concentración de IGF. Por otro lado, la unión de IGF no marcado a las proteínas ligadoras provocaría una falsa disminución en la concentración de la hormona. Por tanto, debe tenerse especialmente en cuenta la interferencia de las IGFBPs cuando se pretende medir IGF en el suero en condiciones fisiológicas inusuales y en estados patológicos, en otros líquidos corporales y medios condicionados (14).

A lo largo del tiempo se han ido desarrollando diversas estrategias para superar este inconveniente, como por ejemplo la preincubación con el antisuero durante varios días antes de añadir el radioligando (286), la prolongación del periodo de incubación (287, 288) o la realización del análisis en presencia de heparina (289). Se ha intentado también evitar la interferencia de las proteínas ligadoras mediante la adición de un exceso de péptido que compita con el radioligando por su unión a estas proteínas pero no al antisuero (290), o bien mediante el empleo de un radioligando,  $^{125}\text{I}$ -trIGF-I (IGF-I truncado), que presenta una baja afinidad por las proteínas ligadoras (291).

Sin embargo, para determinar de manera satisfactoria la concentración de IGF en una muestra, se acepta generalmente que es necesario disociar y separar el péptido de sus proteínas ligadoras antes del análisis (270). La disociación se logra con facilidad mediante acidificación de la muestra; para la separación se han introducido varios procedimientos, el más eficaz de los cuales consiste en la acidificación del suero seguida de filtración en gel (generalmente Sephadex® G-50 o G-75) en medio ácido. Este procedimiento fue descrito inicialmente por Megyesi y cols. (292) y validado para plasma humano por Horner y cols. (267) y Zapf y cols. (293), aplicándose luego a numerosas especies. La cromatografía de exclusión molecular (filtración en gel o HPLC) en medio ácido constituye, hoy por hoy, el método de separación de referencia (14, 267); en nuestros experimentos proporcionó una separación completa, como se evidencia por el control realizado mediante "Western ligand blot" de las muestras filtradas (Ver 3.1.3.). Sin embargo, se le reconoce a este procedimiento un serio inconveniente, y es que el procesamiento de cada muestra requiere gran cantidad de tiempo y es laborioso.

Para obviar este inconveniente se han desarrollado procedimientos alternativos. Franklin y cols. (294) describieron por primera vez un método de extracción en ácido-etanol para eliminar las proteínas ligadoras del suero humano antes del análisis. Este método fue validado y optimizado para su aplicación en el ser humano por Daughaday y

cols. (268), y desde entonces ha sido ampliamente utilizado por numerosos equipos de investigadores, que lo han aplicado a varias especies además del hombre, como la rata, la oveja y los bóvidos, en muchos casos sin establecer plenamente su validez. Así, se ha comprobado (270, 271, 290, 295) que la separación de los IGFs de sus proteínas ligadoras, y en particular de las formas de bajo peso molecular como IGFBP-1 es incompleta. Recientemente se ha introducido una etapa de crioprecipitación a continuación de la extracción en ácido-etanol que parece mejorar la separación y reducir, por tanto, la interferencia de las IGFBPs en el RIA (279, 289). En el trabajo de Breier y cols. (279) se compara este método de extracción mejorado, con la filtración en gel en suero de varias especies, entre ellas la rata, y se concluye que la extracción en ácido-etanol con crioprecipitación proporciona resultados válidos en todas ellas. No obstante, el estudio está efectuado únicamente en suero de ratas adultas normales, y no se extiende a otras situaciones fisiológicas o patológicas.

Recientemente ha sido descrito un método de extracción en ácido fórmico-acetona aplicable a muestras de suero (271). Sus autores hacen una comparación entre la eficacia de este método y la de la extracción en ácido-etanol (sin crioprecipitación), detectando las proteínas ligadoras remanentes en el extracto por medio de FPLC. Concluyen que su método es válido tanto en humano como en rata. No obstante, al igual que en el trabajo de Breier y cols. (279), las muestras de rata que analizan corresponden a animales adultos normales.

Aunque tanto la AEC como la FA han sido validadas en rata adulta, nuestros resultados muestran claramente que estos dos métodos no son válidos para el tratamiento del suero de rata neonatal. En los neonatos subnutridos ambos métodos alternativos sobreestiman los valores de IGF-I obtenidos por el método de referencia (Fig. 3.1.); en los neonatos controles sólo la FA proporcionó valores superiores a los proporcionados por la FG. Además, por lo general estos resultados no reflejan las diferencias que se producen con la edad y el estado nutricional en los niveles de IGF-I. El análisis de regresión lineal entre los valores de IGF-I obtenidos en el RIA tras extracción en FG y los valores obtenidos tras AEC o FA (Tabla 3.1.) mostró una buena correlación, y con una pendiente muy próxima a 1, sólo en ratas adultas, tanto controles como subnutridas, tras AEC. Estos resultados están de acuerdo con un trabajo previo de Crawford y cols. (296), en el que se comparan estos dos métodos con la HPLC en suero de rata adulta.

Los mecanismos implicados en la interferencia de las IGFBPs en el RIA de IGF-I son complejos, y en ellos intervienen probablemente la distribución y las cantidades relativas de los diferentes tipos de IGFBPs en el suero. Mediante análisis por "Western ligand blot" hemos estudiado qué tipos de proteínas ligadoras y en qué cuantía es capaz de eliminar cada uno de los métodos de extracción que hemos considerado. El análisis del suero, extractos y precipitados (Figuras 3.2. y 3.3.) muestra tres grupos de bandas con pesos

moleculares aparentes de 24, 30 y 40-50 kDa; este último se aprecia en algunos casos como doblete. Las bandas de 40-50 kDa han sido identificadas por otros autores (297) como IGFBP-3; las diferentes bandas corresponden a variantes de glicosilación de esta proteína (70). La banda de 30 kDa está constituida probablemente por varios tipos de IGFBPs que, por su similar peso molecular aparente, no se resuelven con este método (174, 105). En periodo perinatal esta banda está constituida en su mayor parte por IGFBP-2 (101), como hemos demostrado mediante "Western immunoblot" (Fig. 2.9.). También en torno a 30 kDa se han detectado IGFBP-1 (206), fragmentos de IGFBP-3 (171) y formas glicosiladas de IGFBP-4 (298). Se ha sugerido que la banda de 24 kDa corresponde a IGFBP-4 (299). Finalmente, se ha descrito la presencia en el suero de rata adulta de IGFBP-5 y 6, pero la identificación con alguna de las bandas detectadas mediante "Western ligand blot" no se ha llevado a cabo aún (61).

La proporción de los tres grupos de bandas en el suero no extraído (Fig. 3.4.) muestra un incremento gradual en IGFBP-3 y un descenso en la banda de 30 kDa con la edad. Los animales subnutridos muestran mayores niveles que los controles en esta última banda durante el periodo neonatal (10 y 20 días), lo que sugiere un retardo en esta población en alcanzar el patrón de bandas de la rata adulta control. Este patrón alterado se observa también en IGFBP-4. La diferente distribución de los tres grupos de bandas a lo largo del desarrollo hace muy apropiado este análisis para explicar las diferentes cantidades de IGFBPs remanentes en los extractos tras el tratamiento del suero con AEC o FA en las dos poblaciones estudiadas. Aplicando este método de "Western ligand blot" a nuestro estudio hemos comprobado que la filtración en gel proporciona una separación completa de las IGFBPs del suero de rata independientemente de la edad o del estado nutricional del animal (Ver 3.1.3.), lo cual demuestra la validez de este método de separación como método de referencia. Tanto la AEC como la FA son más eficaces, por lo general, eliminando la IGFBP-3 del suero (Figs. 3.4. y 3.5.). En cambio, la proporción de formas de menor peso molecular (30 y 24 kDa) eliminadas por ambos métodos es menor, sobre todo con FA en suero de ratas subnutridas. Crawford y cols. (296), en un estudio más limitado, habían llegado a una conclusión similar empleando también el análisis de "Western ligand blot" de extractos de AEC y FA. Se ha señalado que las IGFBPs del suero de rata causan una mayor interferencia en el RIA de IGF-I que las IGFBPs del suero humano (270); la mayor afinidad por IGF-I de la IGFBP-3 en la rata, en comparación con el humano, puede ser la causa de este hecho (297). Nuestro estudio muestra, sin embargo, que las formas de 40-50 kDa, correspondientes a IGFBP-3, son las más eficazmente eliminadas por ambos métodos, lo que explica además que hayan sido validados para su empleo en el suero de rata adulta, donde IGFBP-3 es la forma más abundante. No podemos excluir, sin embargo, la presencia, en los extractos, de IGFBPs no detectadas por "Western ligand blot".

La interferencia que causan las IGFBPs en los valores de IGF-I obtenidos por RIA en los extractos de AEC y FA fue mayor en las ratas subnutridas que en las controles a 10 y 20 días. Los niveles más elevados de IGFBPs de bajo peso molecular en suero, junto con la menor eficacia de las extracciones en AEC y FA podrían explicar la mayor interferencia de estas IGFBPs en las muestras de ratas subnutridas, sobre todo en muestras extraídas por FA (Fig. 3.1.). Las IGFBPs de bajo peso molecular interfieren en el RIA de IGF-I probablemente por competición directa con el anticuerpo por su unión al radioligando; los resultados proporcionados por el RIA dependerán por tanto de la afinidad del antisuero por IGF-I (291). El antisuero empleado por nosotros consiste en una mezcla de anticuerpos con un rango de afinidades por IGF-I de  $0,71$  a  $17,14 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$  (Ver 2.4.2.3.), que es del mismo orden de magnitud que la  $K_a$  de la mayoría de las IGFBPs (61, 62). Una idea del grado de interferencia de las IGFBPs la da la curva de calibración por RIA de las columnas de Sephadex® G-50 empleadas en la filtración de los sueros (Fig. 2.1.). La presencia de inmunorreactividad en una serie de fracciones en las que no eluye IGF permite identificar las IGFBPs y excluir esas fracciones a la hora de extraer IGF de las muestras de suero.

Por otro lado, la correlación aparentemente pobre entre las IGFBPs remanentes en los extractos AEC y FA (Figs. 3.2. y 3.4.) y los niveles de IGF-I obtenidos (Fig. 3.1.) en algunos estadios podría indicar que el mecanismo de la interferencia reside en relaciones alteradas entre IGF-I y las diferentes formas de IGFBPs tras el proceso de extracción. A este respecto nuestros resultados concuerdan con los obtenidos por Bang y cols. (291) en un trabajo comparativo reciente, en el que hallan que la AEC proporciona resultados erróneos en los niveles de IGF-I sérico en pacientes con acromegalia o con déficit de GH (situaciones caracterizadas por niveles de IGF-I anormalmente elevados o disminuídos, respectivamente), y atribuyen el error a diferencias en la relación IGF-I/IGFBP-1 remanente. En la misma línea se sitúa el trabajo de Breier y cols. (279), que atribuye la no validez del método de AE (sin crioprecipitación) para la determinación de las concentraciones de IGF-I en plasma de oveja fetal a la diferencia en la relación IGF-I/IGFBP en plasma entre el feto y el adulto.

Concluimos de nuestros resultados la no validez de ninguno de los métodos de extracción (en ácido-etanol con crioprecipitación y en ácido fórmico-acetona) alternativos a la filtración en gel, para la cuantificación de los niveles de IGF-I en suero de rata en etapa neonatal y/o sometida a subnutrición proteico-energética. La filtración en gel parece, por tanto, el método idóneo para separar las proteínas ligadoras de IGF y evitar su interferencia en el RIA. Este estudio corrobora la validez de la AEC como un método de extracción previo a la determinación radioinmunológica de la concentración de IGF-I en suero de rata adulta, incluyendo la situación de subnutrición, en la cual los niveles de IGF-I están disminuídos. Por otro lado, la extracción en FA debe descartarse para medición de IGF-I en ratas, tanto neonatales como adultas.

Estos resultados nos han obligado, en lo sucesivo, a la utilización, en este trabajo, de la filtración en gel previa a la determinación de la concentración de IGFs en el suero de rata en periodo fetal y neonatal. Sin este estudio comparativo los valores obtenidos al emplear cualquiera de los métodos de extracción alternativos a la FG habría carecido de todo rigor experimental. Este trabajo metodológico acaba de ser aceptado para su publicación en *Journal of Endocrinology* (300).

## **4.2. Cambios en los IGFs y las IGFBPs en la gestación. Efectos de la subnutrición y la diabetes**

### **4.2.1. Cambios en los IGFs en la rata gestante.**

Las primeras determinaciones de los niveles de IGFs en la rata gestante mostraban ya un descenso en los niveles de IGF-I en suero al final de la gestación (149, 301, 302). Posteriormente se comprobó (196, 206) que este descenso en los niveles de IGF-I se inicia hacia el día 12º de gestación, manteniéndose hasta el parto para restablecerse poco después del mismo. En un trabajo reciente Donovan y cols. (197) extienden su estudio a todo el periodo gestante, observando una elevación en los niveles de IGF-I al inicio de la gestación (días 5º y 10º) y posteriormente un descenso, para recuperarse dos días después del parto los niveles de la rata no gestante. Nuestros resultados están en consonancia con estas observaciones. En el periodo de gestación estudiado por nosotros (días 17 a 21) encontramos, en las tres poblaciones de ratas (subnutridas, controles y diabéticas) niveles de IGF-I en suero significativamente más bajos que los presentes en la rata virgen (Fig. 3.7.), con un descenso adicional a 21 días. Este descenso en los niveles de IGF-I en suero descrito en roedores (197, 303) contrasta con lo observado en la mujer gestante, en la que los niveles de este péptido experimentan un incremento progresivo a lo largo de la gestación, alcanzando los valores más altos en el último trimestre. Poco después del parto los niveles de IGF-I tienden a recuperar los valores presentes en la mujer no gestante (198-201).

Se han propuesto varias explicaciones para estos cambios en IGF-I circulante en la rata gestante. Davenport y cols. (196) han observado que los cambios en la concentración sérica de IGF-I al final de la gestación e inmediatamente después del parto se correlacionan con niveles bajos de péptido en hígado (196), y se ha descrito además una reducción en la abundancia de mRNAs hepáticos de IGF-I de aproximadamente el 40% respecto a la rata no gestante, y una recuperación a los 4 días postparto (196). Sin embargo, en un trabajo reciente de Travers y cols. (304) describen un aumento del peso del hígado en la rata gestante, sobre todo en la mitad y el final de la gestación. Cuando la cantidad de mRNA de IGF-I total hepático se corrige en función del contenido total de RNA del hígado lo que se constata en realidad es un incremento progresivo de este

parámetro en la gestación. Por otro lado, Davenport y cols. (196) han comprobado que el  $^{125}\text{I}$ -IGF-I es eliminado del suero de rata gestante casi 5 veces más rápido que en la rata posparto, sin que haya diferencias significativas en las tasas de producción de IGF-I. Esto podría ser debido a la disminución de IGFBP-3 observada en el suero de la rata gestante (Ver más adelante); un descenso de IGFBP-3 circulante conllevaría un descenso en el complejo de 150 kDa, que actúa como reservorio de IGF impidiendo su paso a través de los capilares.

Por último, en cuanto a IGF-II, en la mujer gestante se han descrito elevaciones más ligeras de sus niveles (200), aunque otros autores no encuentran cambios (201). En este trabajo no hemos determinado la concentración de IGF-II en suero de rata adulta (incluyendo la rata gestante) debido a que la sensibilidad del RRA no permite cuantificar los bajos niveles presentes en estos animales. Sin embargo otros autores (197) encuentran niveles muy bajos (en torno a 20 ng/ml) que no se alteran a lo largo de la gestación.

#### **4.2.2. Cambios en las IGFBPs en la rata gestante.**

El análisis de las IGFBPs del suero mediante "Western ligand blot" (Figs. 3.8. y 3.9.) mostró un marcado descenso en las bandas de 40-50 kDa (IGFBP-3), hasta el punto de hacerse indetectables a 18, 19 y 21 días. Además se produjo un descenso generalizado en el resto de formas, ya que, como se ha señalado en Resultados (Ver 3.2.4.), fue necesario aplicar mayor cantidad de suero a los geles y prolongar el tiempo de exposición de las películas para obtener una buena señal. No se apreciaron cambios notables en la proporción de las bandas de 27-30 kDa y 24 kDa (IGFBP-4) entre 18 y 21 días de gestación, y las diferencias entre los distintos tratamientos fueron de escasa cuantía, lo que a su vez concuerda con la ausencia de diferencias en la concentración de IGF-I entre los tres tratamientos en los tres días de gestación estudiados. Resultados similares describen Fielder y cols. (303) en el ratón gestante. Cambios más notables se apreciaron en las gestantes subnutridas el día 17 de gestación cuando la subnutrición comenzó el día 14, con un ligero descenso en IGFBP-3 (que ya de por sí dio escasa señal en la autorradiografía) y en las bandas de 27-30 kDa; la proporción de las bandas de 24 kDa aumentó como consecuencia del descenso en la proporción del resto de bandas. Estos cambios son similares a los encontrados por nosotros en la rata macho adulta sometida a subnutrición, y se discuten más adelante (Ver 4.5.). Para el análisis mediante "Western immunoblot" (Fig. 3.9.) fue necesario igualmente prolongar el tiempo de revelado de la membrana para detectar la banda correspondiente a IGFBP-2. Los bajos niveles de esta IGFBP en el suero son característicos de la rata adulta, y la gestación no parece acompañarse de cambios en esta forma de proteína ligadora, salvo quizá un descenso a 21 días. Aunque lo reducido del tamaño muestral no permite extraer conclusiones fiables, sí parece advertirse una intensidad mayor de esta banda en las gestantes subnutridas, lo cual está en la línea de los cambios que la subnutrición provoca en la rata adulta no gestante (92, 101-103).

Draznin y cols. (301) ya habían descrito, mediante un BPA competitivo, que las proteínas ligadoras de IGF están disminuidas en la rata gestante. Este resultado se ha confirmado mediante cromatografía de exclusión molecular en medio ácido (206), a la par que se ha comprobado cómo al final de la gestación se produce en suero un predominio de las formas de 40-50 kDa sobre las de 150 kDa, al contrario de lo que sucede en el suero de rata no gestante. Mediante "Western ligand blot" varios autores han constatado, durante la primera mitad de la gestación, un incremento en IGFBP-3 y en las formas de 28-29 kDa, en tanto que no hay cambios en la forma de 24 kDa (196, 197, 206). Por el contrario, en la segunda mitad de la gestación tanto IGFBP-3 como las formas de 28-29 kDa experimentan una intensa disminución, mientras que la forma de 24 kDa no cambia o aumenta ligeramente, resultados similares a los encontrados por nosotros. A los 2-4 días después del parto el patrón es similar al de la rata no gestante (196, 197, 206).

Alteraciones similares a las descritas en la rata se han señalado también en el suero de mujer gestante mediante diversas técnicas. Así, mediante cromatografía de exclusión molecular en medio ácido Gargosky y cols. (305) han observado un paso del predominio de las formas de 150 kDa en la mujer no gestante a un predominio de las de 40 kDa hacia el final de la gestación. Los trabajos efectuados mediante "Western ligand blot" (108, 109, 200, 305, 306) describen un progresivo descenso en la intensidad de las bandas correspondientes a IGFBP-3 (que llega a hacerse prácticamente indetectable al final de la gestación), IGFBP-2 e IGFBP-4, en tanto que en la banda correspondiente a BP-1 no se aprecian cambios o se detecta un aumento de la intensidad. Estos cambios se revierten tras el parto, aunque perduran todavía, de forma menos marcada, durante la lactancia.

El estudio en la rata gestante de la expresión hepática de las distintas proteínas ligadoras mediante "Northern blot" (197) ha puesto de manifiesto la ausencia de cambios en IGFBP-2 (que apenas resultó detectable) y, paradójicamente, IGFBP-3. Por tanto, la desaparición de IGFBP-3 del suero no es debida a un descenso en su expresión hepática, sin que se dé tampoco un aumento compensatorio en la misma. Por el contrario, tanto el mensajero de IGFBP-4 como el de IGFBP-1 experimentaron un incremento significativo en la segunda mitad de la gestación. Al segundo día posparto el mRNA de IGFBP-1 se había reducido a niveles indetectables, en tanto que el de IGFBP-4 continuaba ligeramente elevado. No debe perderse de vista, sin embargo, que el hígado no es la única fuente de IGFBPs (de hecho, IGFBP-3 se expresa más abundantemente en riñón que en hígado) (77). Habría que evaluar, por tanto, la contribución de otros tejidos a los cambios en las IGFBPs circulantes. También hay que considerar las limitaciones del método de "Western ligand blot", ya que la señal obtenida en la autorradiografía depende no sólo de la cantidad de IGFBP presente, sino también de sus propiedades cinéticas, las cuales pueden verse alteradas por las condiciones extremas a que se debe someter la muestra para su análisis por este método.

Estos cambios descritos en las IGFBPs del suero de rata (196) y de mujer (108, 109) gestantes se han atribuido a la presencia de una o varias actividades proteolíticas específicas. En el suero de rata esta actividad aparece hacia la segunda mitad de la gestación (197, 307) y se incrementa progresivamente hasta el momento del parto, desapareciendo inmediatamente después (197). Los cambios en la actividad proteasa de IGFBP-3 se correlacionan negativamente con los cambios en los niveles séricos de IGFBP-3 (detectados por "Western ligand blot") y de IGF-I (197), y se corresponden con un incremento del aclaramiento y captación periférica de IGF-I sérico (196) ya mencionados. Diversos experimentos han tratado de caracterizar esta actividad proteolítica mediante "Western ligand blot", habiéndose comprobado que se trata de una serina-proteasa (307) no específica de especie (196, 197, 303). Mediante el empleo de  $^{125}\text{I}$ -rhIGFBP-3 glicosilada se han caracterizado los fragmentos que resultan de la proteólisis de IGFBP-3. La incubación de esta proteína con suero de rata (307), ratón (303) o mujer (108), o extractos de útero y decidua de rata (307) gestantes proporciona fragmentos de 29-31 kDa y 18-23 kDa. Estos fragmentos, detectados también mediante "Western ligand blot" en suero de mujer gestante, parecen conservar la capacidad de unir IGF, aunque con menor afinidad que la proteína intacta (108, 109, 308).

No se poseen datos acerca de las concentraciones séricas de las IGFBPs en la rata gestante determinadas por procedimientos radioinmunológicos. En la mujer gestante IGFBP-1 es la proteína ligadora mejor caracterizada. Sus niveles empiezan a incrementarse hacia el final de primer trimestre, alcanzando un pico a término, con unos valores 10 veces superiores a los normales en la mujer no gestante (82, 202, 203), elevación que corre paralela a la que experimentan los niveles de progesterona. Está bien establecida la regulación de la expresión del gen y de la síntesis de esta proteína en el endometrio/decidua, suponiéndose que es este tejido el origen de su síntesis durante la gestación (204, 205).

Por lo que respecta a los niveles de IGFBP-3 medidos mediante RIA, se ha descrito una elevación de los mismos, que casi se doblan durante el último trimestre de la gestación (104). También se produce un moderado incremento de los niveles de ALS inmunorreactiva al final de la gestación (66). La discrepancia entre los niveles de IGFBP-3 en la mujer gestante obtenidos mediante RIA y los resultados proporcionados por la técnica de "Western ligand blot" se atribuyó en un principio al efecto de la proteasa asociada a la gestación: la IGFBP-3 degradada estaría estructural y funcionalmente alterada, pero conservaría sus sitios antigénicos, que serían incluso más accesibles. Estudios recientes basados en la cromatografía de exclusión molecular en medio neutro, parecen apuntar a otra explicación. Gargosky y cols. (200) y Wang y Chard (306) han comprobado que en la mujer gestante (3<sup>er</sup> trimestre) ambos IGFs se distribuyen predominantemente en el complejo de 150 kDa, de modo similar a lo que sucede en la mujer no gestante. Suikkari



y Baxter (201), por otro lado, han comprobado que los perfiles de elución de inmunorreactividad de IGFBP-3 y ALS no experimentan cambios durante la gestación con respecto a la mujer no gestante, suponiendo la IGFBP-3 en todos los casos un 85-90% de la inmunorreactividad en el complejo de 150 kDa. Así pues, aparentemente IGFBP-3 conserva, durante la gestación, su capacidad para unir IGF y formar complejos ternarios. Es posible que, debido al efecto de una proteasa de origen placentario, se produzca una hidrólisis parcial de IGFBP-3 que altere su estabilidad durante tratamientos bruscos (lo que explicaría su indetectabilidad por "Western ligand blot" o tras acidificación prolongada) sin por ello alterar su capacidad para formar complejos ternarios de 150 kDa, aunque con menor afinidad por IGF. Una posible explicación la da un trabajo reciente de Suikkari y Baxter (207). Según estos autores IGFBP-3 en el suero de mujer gestante es incapaz de unir yodo-IGF-I, pero une IGF-I nativo. No hay datos, hasta la fecha, que indiquen que en la rata se produzca una situación similar a la descrita en humano.

#### **4.2.3. Implicaciones fisiológicas.**

Los cambios en IGF-I e IGFBP-3 en la rata gestante coinciden en el tiempo con un profundo cambio en el metabolismo materno, que pasa de una fase anabólica a otra catabólica. Se ha postulado que los cambios funcionales en IGFBP-3 durante la gestación, debidos a desestabilización del complejo de 150 kDa por la actividad proteasa, resultarían en un incremento de la disponibilidad de IGFs para el crecimiento fetoplacentario (108, 109, 305); la mayor parte del IGF circularía unido a las formas de bajo peso molecular. Debido a la alteración del patrón de IGFBPs, los IGFs podrían ejercer mayor influencia sobre la distribución de los nutrientes en el animal gestante que en el no gestante. Se trataría, pues, de una respuesta adaptativa a las demandas de la gestación. La regulación de la proteólisis de IGFBP-3 podría a su vez regular las acciones locales de IGF. A favor de esta hipótesis estaría el hecho de que se ha detectado la presencia de actividad proteasa en el suero en otras situaciones catabólicas (enfermos en estado crítico tras cirugía mayor, pacientes con neoplasias) (68, 309).

Aunque la fuente y el control hormonal de esta actividad proteasa se desconocen, la aparición gradual de la misma durante la gestación y la posterior desaparición inmediatamente tras el parto sugiere que la placenta o la decidua es una fuente potencial de esta actividad enzimática. En efecto, toda la serie de cambios descritos coinciden con el desarrollo de la placenta corioalantoidea y el establecimiento de la circulación materno-fetal en la rata. En la mujer gestante el patrón de aparición y desaparición de esta actividad enzimática es paralelo al de los esteroides y hormonas polipeptídicas derivados de la placenta (fundamentalmente el lactógeno placentario).

La disparidad en el comportamiento de IGF-I en rata y en humano podría explicarse por el hecho de que la rata soporta 3 veces más tejido fetal que la mujer gestante (en

términos de peso corporal), y el feto de rata a término crece 20 veces más rápido que el feto humano (310), lo que supone un mayor incremento proporcional en las demandas de energía durante la gestación en la rata. Por tanto, la rata necesitaría un catabolismo de la proteína materna durante la gestación que explicaría los diferentes efectos de la gestación sobre el IGF-I sérico.

Finalmente, el hecho de que ni la subnutrición ni la diabetes provoquen alteraciones en el patrón de cambios de IGF-I e IGFBPs que tiene lugar en la última etapa de la gestación, a pesar de resultar en una disminución de la ganancia de peso (más evidente en la subnutrición) sugiere que los mecanismos que regulan los componentes del sistema IGF sufren un profundo cambio en la etapa gestante, de manera que los factores nutricionales y la acción de la insulina pasan a un segundo plano. En esta línea, Gargosky y cols. (206) proponen que el descenso de IGFBP-3 e IGF-I se debe a un estado de resistencia a GH, ya que se ha observado que los niveles basales de GH circulante y la amplitud de los pulsos se incrementan durante la gestación hacia la misma época en que se da el descenso de IGFBP-3 e IGF-I (311). Travers y cols. (304), por su parte, no observan alteraciones en el ligamiento de GH a receptores hepáticos en la rata al final de la gestación, y proponen que esta resistencia es postreceptorial. Se ha comprobado también que la administración de GH a ratas gestantes carece de efectos sobre la concentración de IGF-I (312). Toda esta serie de cambios tendría un sentido fisiológico: aunque IGF-I media los efectos anabólicos de GH, los efectos catabólicos, como la movilización de lípidos del tejido adiposo, son directos. Así, niveles elevados de GH (y lactógeno placentario, cuya estructura es muy similar a la de GH) con concentraciones bajas IGF-I al final de la gestación tendrían el efecto de reducir los procesos anabólicos, favoreciendo la liberación de lípidos.

Puesto que el descenso en la concentración de IGF-I que tiene lugar tanto en la diabetes como en la subnutrición en rata no gestante se ha intentado explicar en parte por una resistencia a GH (Ver 1.3.), es posible que la falta de efecto de ambas situaciones sobre los niveles de IGF-I en la rata gestante se deba a que este mecanismo de resistencia a GH ya está previamente establecido por la gestación. Por otro lado, los altos niveles de lactógeno placentario que se observan en la gestación podrían contribuir a impedir un mayor descenso en los niveles de IGF-I por efecto de la subnutrición o la diabetes que se produciría en otras circunstancias (313, 314). Los cambios que se observan en la ganancia de peso son quizá un efecto directo de la falta (en la subnutrición) o el mal aprovechamiento (en la diabetes) de los nutrientes, sin que en este hecho medie IGF-I.

#### **4.3. Subnutrición y diabetes en periodo fetal**

El papel de la insulina y los nutrientes en la regulación del sistema IGF en periodo fetal es poco conocido. A ello contribuyen en parte la complejidad de los cambios metabólicos

y hormonales que tienen lugar en esta etapa y las grandes lagunas de conocimiento que aún existen acerca de las interacciones entre el feto, la placenta y la madre gestante.

Para abordar el estudio de los efectos de los nutrientes y la insulina en la regulación de los IGFs y sus proteínas ligadoras en el feto nos hemos valido, por un lado, de un modelo de restricción proteico-energética que se comienza el día 14 o el día 16 de gestación, y por otro lado de un modelo de diabetes por STZ en el que este fármaco se administra a la rata gestante en las mismas fechas. El motivo de iniciar las situaciones de subnutrición o diabetes en dos momentos es el siguiente. Como se ha adelantado en la Introducción (1.2.2.1.), en la rata fetal la secreción de insulina no depende de la glucosa hasta el día 18-19 de gestación (141). Con la subnutrición o la administración de STZ el día 16 pretendemos estudiar el papel de los nutrientes y la insulina en la regulación de los IGFs en una etapa en la cual la insulina actúa como glucorregulador, mientras que con las mismas situaciones desde el día 14 este estudio se aborda en una etapa en la cual esta hormona actúa aún fundamentalmente como agente anabólico cuya secreción no parece depender de la glucosa, sino de los aminoácidos (315). Discutiremos en primer lugar los cambios observados con los modelos desde el día 16 de gestación y más adelante los observados en los modelos desde el día 14.

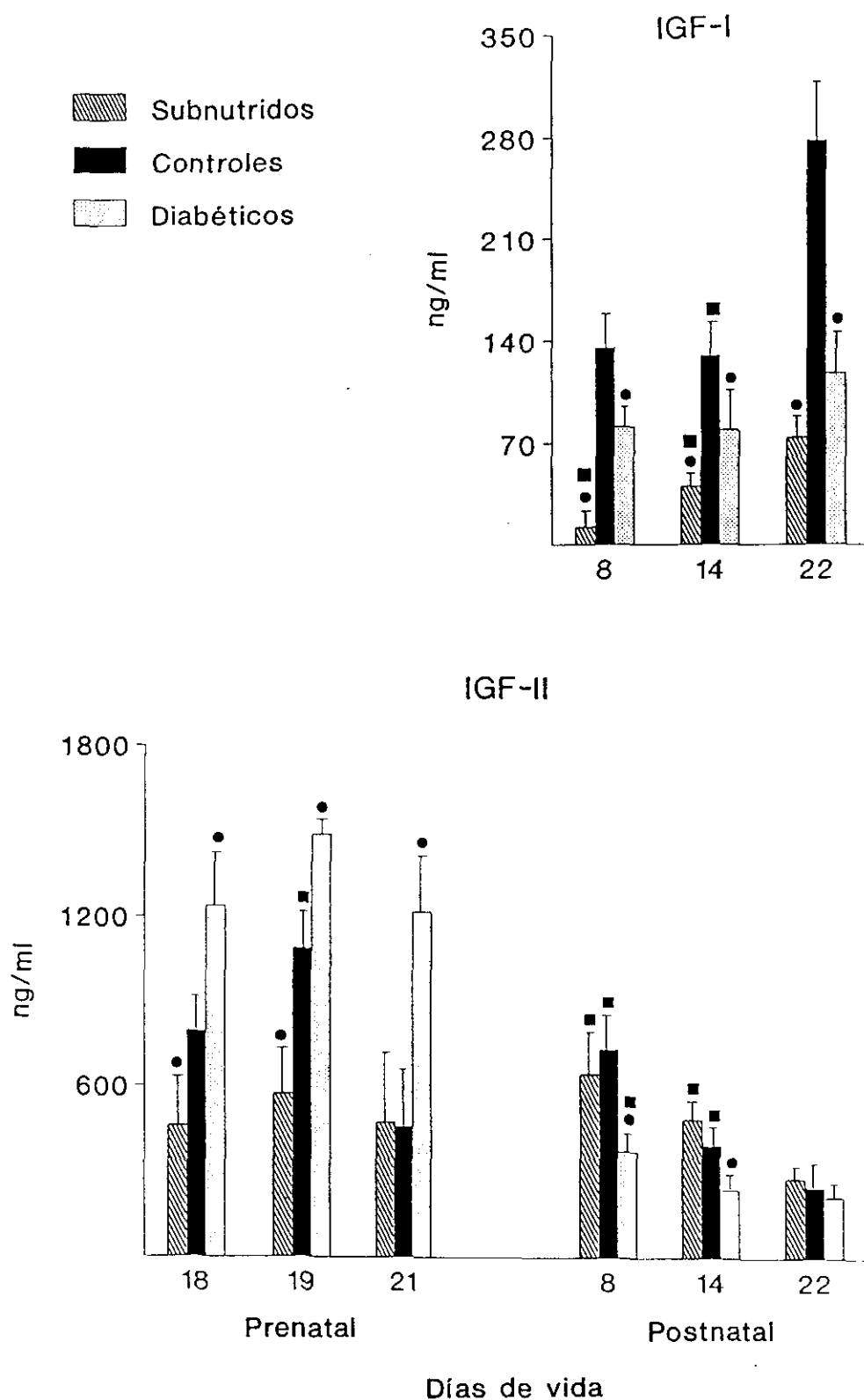
En todo caso, la gran elevación de la glucemia observada en las madres diabéticas (que implica un notable incremento en las cantidades de glucosa transferidas al feto), y que no se aprecia en las subnutridas, es un factor importante a la hora de abordar el estudio comparativo de la regulación de los IGFs y sus proteínas ligadoras en ambas poblaciones.

#### **4.3.1. Subnutrición y diabetes desde el día 16 de gestación.**

##### **4.3.1.1. Efectos de la subnutrición y la diabetes sobre los niveles de IGFs.**

Concomitantemente con el incremento de la glucemia materna, en los fetos de gestante diabética se observaron valores marcadamente elevados (en comparación con los fetos control) de este azúcar en sangre, junto con un moderado descenso de la insulinemia. Ambos parámetros, en cambio, no se vieron alterados en los fetos de rata subnutrida (salvo un moderado incremento de la insulinemia a 21 días) (Tabla 3.2.). Los niveles de IGF-II en el suero de los fetos de gestantes diabéticas se encontraban elevados con respecto a los de los fetos control en los tres estadios estudiados (18, 19 y 21 días), mientras que en los de madre subnutrida se observó un descenso a 18 y 19 días (Fig. 4.1.).

En este último modelo experimental no encontramos, a 21 días, diferencias significativas en los niveles de IGF-II entre los fetos controles y los fetos de madre subnutrida (Fig. 4.1). Sin embargo, el día 21 se produjo en los fetos control un descenso significativo con respecto al día 19 que probablemente forme parte del patrón ontogénico



**Figura 4.1.** Niveles de IGF-I e IGF-II en suero de fetos y neonatos en los modelos de subnutrición y diabetes estudiados en este trabajo. La subnutrición, tanto en etapa fetal como neonatal, comenzó el día 16 de gestación. La diabetes en etapa fetal se provocó por inyección de STZ a la rata gestante el día 16, y en etapa neonatal por inyección de STZ a las crías a los 4 días postparto. Ver figuras 3.11 y 3.17 para más detalle. ● Significación estadística con respecto al grupo control. ■ Significación estadística con respecto al grupo de edad inmediatamente superior.

de este péptido en la rata, ya descrito en la introducción (Ver 1.2.3.1.). Así pues, una posible explicación de esta ausencia de diferencias a 21 días sería que el gen de IGF-II se expresa ya de por sí a una tasa lo suficientemente baja como para no verse afectado por una situación que, en otras circunstancias, provocaría un descenso de su expresión. Este extremo, no obstante, está pendiente de confirmación. Una situación similar se ha observado en la cobaya gestante sometida a restricción alimentaria (la restricción fue de un 40%, similar a la empleada en nuestro modelo) lo largo de la gestación (242). En esta especie se produce normalmente un pico en la concentración de IGF-II en el último tercio de la gestación, que se redujo considerablemente en los fetos de cobaya subnutrida; al final de la gestación y a término los niveles de IGF-II eran similares y muy bajos en ambas poblaciones. Desconocemos si en la rata fetal los niveles de IGF-II circulante se comportan de la misma manera que en el cobayo, ya que no conocemos ningún estudio en el que se hayan determinado estos niveles en un periodo de gestación lo suficientemente largo. Las razones son quizá de índole técnica, ya que a 17 días de gestación nos fue difícil extraer sangre del feto por su reducido tamaño.

Las diferencias tan marcadas en los niveles de IGF-II en suero en las tres poblaciones de fetos que hemos estudiado pueden explicarse por la distinta situación metabólica a que están sometidos los fetos de ambas poblaciones en una fase del desarrollo en la cual el crecimiento sigue una pauta exponencial y los requerimientos de sustratos energéticos son máximos. En los fetos de madre diabética la glucemia elevada, junto con la insulinemia sólo moderadamente disminuida, favorecería un ambiente anabólico, mientras que en los fetos de madre subnutrida, aunque el aporte de glucosa (al igual que la insulinemia) no parece estar perturbado, el aporte de otros principios inmediatos, como los aminoácidos está muy probablemente limitado, con lo que los procesos anabólicos se ven restringidos. Esto justificaría que el peso al nacimiento de los fetos de madres subnutridas fuese casi un 30% inferior al de los fetos de madres alimentadas *ad libitum* (Ver 3.2.6. y Fig. 3.10.). No se observaron cambios, sin embargo, en el peso de los fetos de madre diabética ni durante la etapa fetal estudiada ni al nacimiento. Esto quizá haya que achacarlo a los niveles de insulina disminuidos que presentan estos fetos. Como ya se adelantó en la Introducción (Ver 1.2.2.), se atribuye a la insulina un importante papel en la regulación del crecimiento fetal. Al final de la gestación la insulina y la GH, entre otros factores, se consideran responsables del acúmulo de glucógeno y lípidos (316) que permitirá al neonato afrontar las primeras fases de la vida extrauterina. En el feto de madre diabética, síndrome bien conocido en pediatría, la hiperglucemia se acompaña de hiperinsulinemia, lo que favorece el acúmulo de grasa y explica el sobrepeso al nacimiento (24, 141). En nuestro caso la hipoinsulinemia moderada no permitiría el aprovechamiento del exceso de nutrientes para un sobrealmacenamiento de lípidos, y el resultado sería un peso al nacimiento normal. El modelo de diabetes por STZ en rata gestante no es, por tanto, totalmente comparable a la situación de diabetes gestacional en humano. Un modelo en cierta manera comparable es el de pancreatectomía del feto de oveja (317); en este modelo se produce un retardo del

crecimiento intrauterino acompañado de niveles elevados de IGF-II. No está claro el origen de la hipoinsulinemia en los fetos de rata gestante tratada con STZ. Sin descartar una posible acción tóxica directa de la STZ sobre el páncreas fetal (aunque se cree que ello no es probable), cabe pensar que la hiperglucemia sostenida agota la reserva pancreática de insulina o tiene un efecto tóxico para la célula B. Se ha descrito (318) una inhibición de la secreción de insulina por el páncreas fetal por efecto de la hiperglucemia. En cualquier caso sería interesante valorar la concentración de proinsulina en el feto y efectuar un estudio histológico y funcional del páncreas fetal *in vitro* en estas situaciones.

Las alteraciones encontradas por nosotros en los niveles de IGF-II en suero de fetos de madre subnutrida están de acuerdo con las descritas en otros modelos de restricción dietética, tanto en la rata como en otras especies. Un ayuno durante los últimos 4 días de gestación (aunque no durante 3 días) en la rata (240, 241), durante 2 días a mitad de la gestación en la cobaya (236) o al final de la gestación en la oveja (243), así como la deficiencia proteica prolongada en la rata (239) se acompañan de una reducción de los niveles de IGF-II en el feto. Hill y cols. (238) habían descrito un descenso de un 23% de la actividad somatomedina (en etapa fetal IGF-II en su mayor parte) por bioensayo en el feto de rata tras 96 horas de ayuno. Dwyer y Stickland (242), en el modelo comentado más arriba, consistente en una reducción de un 40% del aporte de alimento a la cobaya durante todo el periodo de gestación, describen una marcada reducción del pico de IGF-II que se produce normalmente en esta especie al final de la gestación.

Por el contrario, en modelos de retardo del crecimiento intrauterino por ligadura de la arteria uterina en la cobaya (319) o por reducción de la masa placentaria en la oveja (320) se ha descrito una elevación de los niveles de IGF-II. En cambio, en un modelo de ligadura de la arteria uterina de 24 horas de duración en la rata el día 19 de gestación Unterman y cols. (245) no encuentran cambios significativos en la concentración de IGF-II. Parece ser, por tanto, que los niveles de IGF-II se elevan (o no cambian) en condiciones que causan hipoxia en el feto, y disminuyen cuando se limita el aporte de nutrientes. La elevación descrita en situaciones de hipoxia está quizá mediada por catecolaminas, ya que se ha observado que la infusión de adrenalina al feto de oveja provoca un aumento de los niveles de IGF-II en el suero (320).

De todo lo que acabamos de comentar parece claro que los niveles de IGF-II se relacionan más con la glucemia o las concentraciones de otros nutrientes que con la insulinemia o el peso fetal. Otros datos de la literatura sugieren que IGF-II podría estar implicado en el metabolismo de la glucosa en periodo fetal. La infusión de glucosa a fetos de oveja o cobaya (236, 243) provoca un incremento de la concentración de IGF-II en el suero de estos animales. En el feto de cobaya la acción de IGF-II se correlaciona con la concentración de glucógeno hepático (236). Es interesante a este respecto la observación de que el páncreas fetal humano libera IGF-II siguiendo un patrón similar al de la insulina

(31). Es posible que IGF-II desempeñe un papel permisivo sobre el crecimiento fetal, mediando la disponibilidad de glucosa. Esto explicaría la influencia aparentemente mayor de IGF-II en el feto, cuyo requerimiento de glucosa es mayor que el del adulto. En todo caso, este mecanismo parece funcionar sólo en periodo fetal, ya que en periodo neonatal la restricción alimentaria no resulta en un descenso de la concentración de IGF-II, y la hiperglucemia (en el neonato diabético) no sólo no produce un incremento en la concentración de este péptido, sino que, por el contrario, sus niveles descienden (Fig. 4.1.).

Los niveles de IGF-I en periodo fetal no pudieron determinarse con fiabilidad en nuestras condiciones de trabajo debido a la interferencia de IGF-II en el RIA de IGF-I. Se admite que en la rata los niveles de IGF-I son bajos en el feto y se incrementan en periodo postnatal, patrón inverso al que muestra IGF-II (151). En diversas especies (rata, cobaya, oveja, humano, ratón) se han descrito niveles bajos de IGF-I en suero en periodo fetal (14), lo cual parece ser una característica común de la endocrinología fetal. Aunque la presencia de niveles notablemente más elevados de IGF-II que de IGF-I en suero fetal (al menos en roedores) habla en favor de un papel preponderante de IGF-II en el control del desarrollo fetal al final de la gestación (que es cuando se han cuantificado estos factores), numerosos estudios muestran una correlación positiva entre la concentración de IGF-I en suero y el peso fetal (154, 173, 236, 245, 321, 322). En situaciones de retardo de crecimiento intrauterino por diversas causas, como ligadura de la arteria uterina (245, 323), reducción de la masa placentaria en oveja (320), restricción proteica en rata (239), ayuno al final de la gestación en rata (240, 241), subnutrición crónica en cobaya (242), pancreatometomía fetal en oveja (316) y en humano por causas desconocidas (23), se han descrito niveles reducidos de IGF-I.

Estos resultados sugieren un control nutricional de IGF-I al final de la gestación similar al descrito en periodo postnatal por otros autores (Ver 1.3.1.2.) y comprobado por nosotros mismos en este trabajo (Fig. 4.1.). La hipoinsulinemia es una posible explicación del descenso de IGF-I que se ha descrito acompañando al retardo del crecimiento intrauterino. A favor de esta explicación está la comprobación experimental de que la exposición a insulina provoca un incremento de la producción de IGF en hepatocitos de rata aislados (28), explantes de hígado en cultivo (29) e hígado de rata perfundido (30).

En cuanto a la expresión de los genes de IGF-I y II en situaciones de retardo del crecimiento intrauterino, los datos encontrados en la literatura son escasos. Sólo en trabajos recientes se ha abordado este estudio en modelos de restricción nutricional en rata al final de la gestación. Davenport y cols. (240) no observan cambios en el mRNA hepático de IGF-II ni en los niveles del péptido en suero tras un ayuno de tres días. Por su parte Straus y cols. (241), encuentran un ligero descenso (12% aproximadamente) en los niveles de IGF-II tras un ayuno de cuatro días, pero no aprecian cambios en la

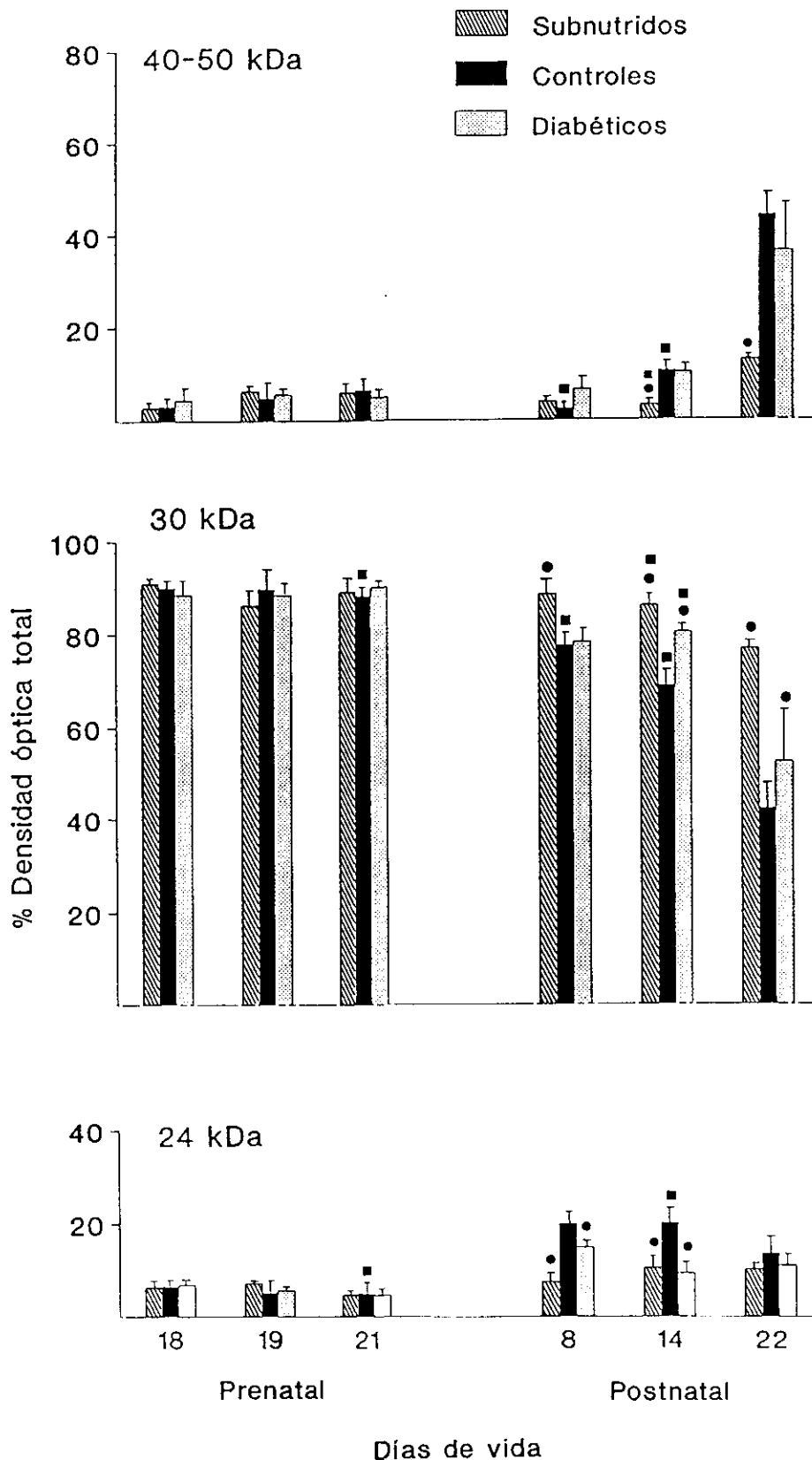
expresión de su gen. La diferencias entre ambos resultados pueden muy bien tener relación con la duración del ayuno. Ambos trabajos coinciden en el hallazgo de un descenso en la expresión del gen de IGF-I en hígado, concomitante con el descenso de la concentración del péptido en suero. Este comportamiento de la expresión del gen de IGF-I es muy similar al descrito en situaciones de ayuno en etapa postnatal (214). Resulta evidente el interés que tiene la determinación de la abundancia del mRNA de ambos IGFs en diversos tejidos para verificar si las alteraciones encontradas tanto en el modelo de subnutrición como en el modelo de diabetes tienen su origen, a su vez en alteraciones de la expresión de los genes respectivos. Este estudio se está llevando a cabo en nuestro laboratorio en la actualidad

#### **4.3.1.2. Efectos de la subnutrición y la diabetes sobre las IGFBPs.**

El resultado del análisis mediante "Western ligand blot" de las proteínas ligadoras de IGF mostró el predominio en suero fetal de las formas de bajo peso molecular (en torno a 30 kDa) (Fig. 4.2.). Esta banda de 30 kDa está constituida por IGFBP-2, como muestra el resultado del "Western immunoblot" con antisuero anti-bIGFBP-2 (Fig. 3.14.). Nuestros resultados coinciden con observaciones previas sobre el desarrollo ontogénico de las IGFBPs del suero (Ver 1.2.3.2.): IGFBP-2 es la proteína ligadora más abundante en el suero fetal, persiste con niveles elevados en etapa postnatal, y es apenas detectable en el individuo adulto (Fig. 2.9.). Estos cambios en el suero son paralelos a los que se producen en la abundancia de su mRNA en diversos tejidos (101). Ello sugiere que esta IGFBP desempeña un importante papel en el desarrollo fetal y neonatal.

A diferencia de lo que sucede en el adulto y el neonato, en los cuales los niveles de IGFBP-2 en suero aumentan en situaciones de restricción dietética (Figs. 3.2.5. y 3.2.6.), a la par que la expresión de su gen en hígado (92, 102, 103), no hemos encontrado cambios de este tipo en el suero fetal. Esta observación está de acuerdo con los resultados de Unterman y cols. (244, 245) en un modelo de retardo de crecimiento intrauterino (en rata) por ligadura de las arterias uterinas, en el que se emplean también "Western ligand blot" y "Western immunoblot". Straus y cols. (241) y Osborn y cols. (247) no encuentran cambios en los niveles hepáticos de mRNA de IGFBP-2 en modelos de ayuno de 72 horas al final de la gestación en rata y oveja respectivamente. Una posible explicación es que este gen de esta IGFBP se expresa en feto a sus niveles más altos, a diferencia del adulto (174), y por ello no puede ser inducido aún más por la restricción de nutrientes. Cabe pensar también que las señales que intervienen en la regulación nutricional de la expresión del gen de IGFBP-2 son distintas a las del adulto; sin embargo, los factores que regulan la expresión del gen de IGFBP-2 en etapa fetal no han sido estudiados en profundidad.





**Figura 4.2.** Análisis de las IGF-BPs del suero de fetos y neonatos en los modelos de subnutrición y diabetes estudiados en este trabajo. La subnutrición, tanto en etapa fetal como neonatal, comenzó el día 16 de gestación. La diabetes en etapa fetal se provocó por inyección de STZ a la rata gestante el día 16, y en etapa neonatal por inyección de STZ a las crías a los 4 días postparto. Esta gráfica recoge los datos de las tablas 3.4 y 3.8. ● Significación estadística con respecto al grupo control. ■ Significación estadística con respecto al grupo de edad inmediatamente superior.

En diversos modelos de retardo de crecimiento intrauterino se ha observado un incremento en los niveles de IGFBP-1 en suero (detectado mediante análisis simultáneo por "Western ligand blot" y "Western immunoblot") o de su mRNA en hígado. Estos modelos incluyen la ligadura de la arteria uterina en rata (244, 245), el ayuno en rata (241) y oveja (247) y la administración de dexametasona en rata (246). Un dato común a muchas de estas situaciones es la hipoinsulinemia. La insulina es un importante regulador de esta IGFBP en etapa postnatal (Ver 1.1.3.5.1.). Se ha observado también que la insulina, al igual que la glucosa, provoca una disminución de la secreción de IGFBP-1 por explantes de hígado fetal humano (324). Sin embargo, otros factores podrían intervenir en la regulación de la producción de esta proteína ligadora, tales como las hormonas contrarreguladoras, la glucosa y otros nutrientes, e IGF-I, que se ha comprobado que están alterados en algunos de estos modelos. En este sentido, Unterman y cols. (245) han observado una buena correlación inversa entre los niveles de IGF-I y los de IGFBP-1 tras corregir el efecto de la insulina.

Estos mecanismos reguladores podrían explicar la aparente ausencia de cambios en IGFBP-1 en nuestros modelos de subnutrición y diabetes en etapa fetal. La ausencia o escasa cuantía de las alteraciones en la glucemia y la insulinemia fetales en nuestro modelo de subnutrición (Tabla 3.2.) concuerdan bien con la ausencia de cambios en IGFBP-1, aunque la escasez de datos en la literatura no permite formular conclusiones definitivas. Así, Davenport y cols. (240), en su modelo en rata de ayuno de 72 horas al final de la gestación, no encuentran diferencias significativas en la glucemia, pero no ofrecen datos de la insulinemia fetal. Unterman y cols. (245), en un modelo en rata de ligadura de la arteria uterina, encuentran la insulinemia reducida casi a la mitad, y en un trabajo previo (325) encuentran reducida también la glucemia. En oveja Osborn y cols. (247) encuentran hipoglucemia e hipoinsulinemia tras un ayuno de 72 horas. En todas estas situaciones se ha descrito un incremento de IGFBP-1. Tras el ayuno de 72 horas, en el modelo en oveja antes comentado, Osborn y cols. (247) han mostrado que la realimentación se sigue de la recuperación de los niveles de IGFBP-1 y su mRNA hepático en el feto, y la hiperglucemia fetal (inducida por la infusión de una solución hipertónica de glucosa) provoca un descenso del mRNA hepático por debajo de los niveles del feto normal, y se acompaña de hiperinsulinemia. En nuestro modelo de diabetes la situación es de hiperglucemia acompañada de hipoinsulinemia, y no hemos observado cambios aparentes en la región de 30 kDa con respecto a los fetos control (Fig. 4.2.). Cabe la posibilidad de que los efectos de la hiperglucemia y la hiperinsulinemia se contrarresten. En cualquier caso, no podemos descartar un posible papel de IGF-I, ya que no conocemos la concentración de este péptido en los fetos en ninguno de los dos modelos. No podemos excluir con certeza, mediante el empleo de "Western ligand blot", que se produzca algún cambio de escasa cuantía en IGFBP-1, ya que IGFBP-1 y 2 migran muy próximas y el predominio de una de ellas (IGFBP-2 en este caso) puede enmascarar la presencia de la otra en la autorradiografía. No obstante, el hecho de que no hallemos alteraciones del peso

corporal en etapa fetal en ninguno de los modelos habla en favor de la ausencia de cambios en IGFBP-1, ya que la concentración de esta IGFBP se ha encontrado inversamente correlacionada con el peso fetal en la rata (245).

Se ha sugerido que los niveles incrementados de IGFBP-1 en la circulación fetal limitarían la disponibilidad y actividad biológica de los IGFs, provocando el retardo de crecimiento intrauterino. Se ha descrito que esta IGFBP atraviesa la barrera vascular con IGFs asociados (95), modulando así la distribución y efectos biológicos de los IGFs. Por otra parte, el incremento en los niveles de IGFBP-1 podría representar una respuesta compensadora a la hipoglucemia fetal observada en algunos modelos. El incremento de IGFBP-1, junto con el descenso de IGF-I e insulina iría dirigido a preservar la euglucemia a expensas del crecimiento fetal. Se ha descrito también una correlación inversa entre los niveles de IGFBP-1 en la mujer gestante y el peso del recién nacido (en concreto, en casos de preeclampsia y retardo del crecimiento intrauterino idiopático) (23). No existen datos al respecto en la rata, pero, como se ha discutido antes (Ver 4.2.1.), sí se ha descrito un incremento de la expresión de su mRNA en hígado de rata gestante. La IGFBP-1 es secretada por la decidua probablemente por efecto de las concentraciones elevadas de progesterona durante la gestación (81). El papel de esta IGFBP se cree que es restringir la invasión del trofoblasto mediante la inactivación de la acción de IGF-I sobre la placenta (23). Parece, por tanto, que IGFBP-1 interviene en la regulación del crecimiento intrauterino tanto del lado materno como del propio lado fetal.

En resumen, nuestros resultados confirman el papel de los nutrientes en la regulación de los niveles circulantes de IGF-II en el feto al final de la gestación, como ya se había sugerido en la literatura.

#### **4.3.1.3. Efectos de la subnutrición y la diabetes sobre los receptores de IGFs.**

Con la determinación del ligamiento específico de IGF-I y II a preparaciones de membrana plasmática de hígado, cerebro y placenta se pretendió estudiar el papel de posibles alteraciones en los receptores que pudieran mediar los efectos de la subnutrición y la diabetes en el desarrollo fetal. No existen trabajos en la literatura en los que se haya abordado el estudio de los receptores en modelos de retardo del crecimiento intrauterino y que nos permitan contrastar nuestros resultados. Es interesante notar que la ausencia de cambios a 19 y 21 días en el ligamiento de IGFs en los dos modelos (Tabla 3.6.) se correlaciona bien con la ausencia de alteraciones en el peso fetal en ambos estadios. Por otro lado, se desprende de nuestros resultados que ni los niveles de IGF-II ni las alteraciones de la insulinemia y la glucemia parecen intervenir en la regulación de estos receptores en periodo fetal.

#### **4.3.2. Subnutrición y diabetes desde el día 14 de gestación.**

Como señalábamos al principio de este apartado, con los modelos de subnutrición y diabetes desde el día 14 de gestación se pretendió abordar el estudio del papel de los IGFs y las IGFBPs en una etapa del desarrollo fetal en la cual la insulina actúa fundamentalmente como agente anabólico y en la que el páncreas no depende de los niveles de glucosa, sino más bien de los de aminoácidos, para la secreción de esta hormona (315).

Con estos modelos hemos observado, en primer lugar, la ausencia de efectos de ambas situaciones sobre el peso fetal a 17 días (Tabla 3.2.), que puede deberse al escaso tiempo transcurrido entre el inicio de los tratamientos y el sacrificio de los animales, a lo cual hay que añadir que en esta etapa del desarrollo fetal los requerimientos de los fetos en su conjunto son aún bajos, y las reservas de la madre son suficientes para hacer frente al estado catabólico provocado por la subnutrición o la diabetes. Idéntica explicación justificaría la ausencia de alteraciones en los niveles de IGF-II en el feto en el modelo de subnutrición que estamos comentando (Fig. 3.11.A).

En los fetos de madre diabética los niveles de IGF-II fueron significativamente más bajos que los de los fetos control (Fig. 3.11.B), hecho que contrasta con lo observado con el modelo de diabetes desde el día 16. Se observó también una ligera reducción en la intensidad de las distintas bandas de IGFBPs (Figs. 3.13. y 3.15.). Esto parece apuntar a que la regulación de la secreción de IGF-II por la glucemia responde a mecanismos distintos en etapas más precoces del desarrollo fetal, a semejanza de lo que sucede con la secreción de insulina. Análogo comentario cabe hacer de la producción de IGFBPs, especialmente IGFBP-2. Razones técnicas derivadas de la dificultad de obtener muestras de sangre de fetos de tamaño tan reducido nos impiden, sin embargo, ampliar este estudio a estadios anteriores al día 17.

#### **4.4. Subnutrición y diabetes en etapa neonatal**

Como hemos comprobado en este trabajo, y como se había descrito previamente en la literatura (Ver 1.3.), tanto la subnutrición como la diabetes provocan un descenso en los niveles de IGF-I circulante y alteraciones en las distintas formas de IGFBPs. Como se discutirá a continuación, ambas situaciones, caracterizadas por un balance de glucemia e insulinemia distinto, presentan, sin embargo, algunos elementos en común. La etapa neonatal es un periodo de transición entre el crecimiento independiente de GH característico del feto y el crecimiento totalmente dependiente de GH del animal de más edad (326). En la rata, tanto en la diabetes como en la subnutrición, se ha descrito un descenso en los niveles de GH circulante y en el contenido de GH en la hipófisis (327, 328). En modelos de restricción proteica y de diabetes experimental se ha descrito también

un estado de resistencia a GH debida probablemente a un defecto postreceptorial (216, 220, 221, 230). Aunque el papel de GH en la promoción del crecimiento inducido por IGF-I se está empezando a esclarecer, los efectos del déficit nutricional y el papel de la insulina, así como la regulación de las distintas IGFBPs y los receptores de IGF durante el desarrollo postnatal no se conocen aún. No existe, hasta la fecha, ningún trabajo comparativo, ni en neonato ni en adulto, que haga referencia al papel de los IGFs y sus proteínas ligadoras en las alteraciones que caracterizan a la subnutrición y a la diabetes. A ello se dirigen las aportaciones que pretendemos ofrecer con este trabajo.

#### **4.4.1. Patrón ontogénico de los IGFs y las IGFBPs en la rata neonatal control.**

Durante el periodo de desarrollo estudiado se produjo en las ratas control alimentadas *ad libitum* un incremento progresivo del peso corporal (Fig. 3.16.) acompañado también de un incremento en los niveles circulantes de IGF-I y de un descenso en los de IGF-II (Fig. 4.2.). La correlación entre el peso y los niveles de ambos IGFs fue alta, de signo positivo para IGF-I y negativo para IGF-II. Este patrón ontogénico ya había sido descrito previamente. Sara y cols. (149) habían comprobado que los niveles de somatomedina A (que hoy sabemos que constituye en su mayor parte IGF-I) determinada mediante RIA son bajos en el feto, incrementándose en periodo posnatal. Por otro lado, Moses y cols. (150) habían hallado, mediante RIA, que las concentraciones de MSA (equivalente a rIGF-II) en el suero de fetos de rata en etapas avanzadas de la gestación era 20 a 100 veces superior a las de la madre; durante las 3 primeras semanas de vida postnatal se producía un progresivo descenso en su concentración hasta hacerse prácticamente indetectable. Daughaday y cols. (151) confirmaron este hecho mediante un RRA específico para IGF-II, y además comprobaron que las concentraciones de IGF-I (determinadas por RIA) en suero de rata en etapa fetal y neonatal eran considerablemente inferiores a las de la madre hasta el final de la lactancia, momento en el que se producía un incremento progresivo. La disponibilidad en los últimos años de IGFs recombinantes ha permitido el desarrollo de RIAs específicos mediante los cuales se han confirmado los datos anteriormente señalados (105). Así pues, en torno al destete se sitúa en la rata el momento en que tiene lugar el cambio del predominio de IGF-II a IGF-I, momento que coincide aproximadamente con la entrada en funcionamiento de la regulación del crecimiento y la producción de IGF-I a través de GH (14). En cuanto a IGF-II, se ha propuesto que la disminución de sus niveles circulantes después del nacimiento se debe a la estimulación de la maduración hepática por el aumento posnatal de los glucocorticoides plasmáticos (36).

Cambios similares a los observados en los niveles de IGFs circulantes se han descrito también en la expresión de los genes correspondientes en diversos tejidos. Los niveles más altos de mRNA de IGF-II se dan en los tejidos fetales y neonatales, y descienden notablemente conforme avanza el desarrollo postnatal (9). Hacia la tercera semana de vida postnatal está muy disminuido, y es prácticamente indetectable en la mayoría de los tejidos

del adulto, con la excepción de cerebro y médula espinal. Por el contrario, la expresión del gen de IGF-I en hígado, principal fuente de este péptido, es baja en etapa fetal y neonatal, y se incrementa con la edad postnatal (9).

También las IGFBPs muestran cambios característicos en etapa postnatal. A 8 y 14 días las formas predominantes son las de bajo peso molecular, sobre todo la banda de 30 kDa (Fig. 4.2.), que constituye un 74,7% de la IGFBP total a 8 días y un 68,7% a 14 días. Esta banda está constituida en su mayor parte por IGFBP-2, tal como muestra el análisis de "Western immunoblot" (Fig. 3.19.). Tanto el "ligand blot" como el "immunoblot" mostraron un claro descenso en la cantidad relativa de esta banda a lo largo de la etapa lactante (Figs. 4.2., 3.19 y 3.20. y Tabla 3.8.), concomitantemente con un incremento en la importancia relativa de las bandas de 40-50 kDa (IGFBP-3). Esta última forma pasa de constituir un 2,5% de la IGFBP total a 8 días a constituir un 44,0% a 22 días, proporción similar a la de la banda (o bandas) de 30 kDa a la misma edad. Así pues, en la rata la transición entre el patrón de bandas (obtenido mediante "Western ligand blot") del neonato y del adulto tiene lugar hacia el inicio de la tercera semana de vida postnatal, y se caracteriza por el paso del predominio de las formas de bajo peso molecular (sobre todo IGFBP-2) en neonato al predominio de las formas de 40-50 kDa (IGFBP-3) en el adulto. Estos cambios suceden a la vez que los descritos para IGF-I y II en la circulación. Todo ello sugiere que el patrón ontogénico de IGFs e IGFBPs está regido por una serie de cambios perfectamente programados.

White y cols. (128) habían descrito el predominio en feto de rata de 19 días de una forma de IGFBP de bajo peso molecular; en adulto, en cambio, predomina una forma de alto peso molecular, produciéndose la transición durante la 3ª semana de vida postnatal. Romanus y cols. (169) demostraron posteriormente que en suero de rata neonatal predomina una forma de IGFBP inmunológicamente idéntica a la de una línea de hepatocitos (células BRL-3A) (correspondiente a rIGFBP-2 según la nomenclatura actual). Los niveles de esta proteína son bajos en cambio en el adulto (169-171).

Donovan y cols. (105) han caracterizado las IGFBPs del suero de rata en etapa neonatal mediante el empleo de "Western ligand blot" e inmunoprecipitación. Nuestros resultados concuerdan esencialmente con lo descrito por estos autores, que encuentran, en el "ligand blot" (los resultados de la incubación con  $^{125}\text{I}$ -IGF-I y  $^{125}\text{I}$ -IGF-II fueron muy similares) un predominio de una forma de 28 kDa (que se identifica como IGFBP-2 y corresponde por tanto a nuestra banda de 30 kDa) hasta el día 21. También detectan una IGFBP de 22 kDa (correspondiente a nuestra banda de 24 kDa), pero no detectan IGFBP-3 hasta el día 19 (nosotros lo detectamos ya a 8 días), y describen además una banda de 26 kDa (sobre todo al incubar con  $^{125}\text{I}$ -IGF-I), poco intensa, que quizá corresponda a la observada por nosotros a 28 kDa en la figura 3.19. Las diferencias encontradas por nosotros con respecto a este

trabajo son probablemente de origen metodológico, debidas quizá al tiempo de exposición de las autorradiografías.

En un trabajo reciente Babajko y cols. (174) han estudiado el patrón ontogénico de IGFBP-1 y 2 y sus mRNAs en la rata en etapa fetal y postnatal. Tanto el mRNA hepático como los niveles en suero (determinados mediante "Western ligand blot" y "Western immunoblot") de ambas están elevados en el momento del nacimiento, y experimentan un progresivo descenso postnatalmente. En el adulto IGFBP-1 es prácticamente indetectable en el suero, mientras que los niveles de IGFBP-2 son muy bajos. Estos resultados son coincidentes con otros previos en rata (92, 101, 176) y humano (173).

No se conocen aún los mecanismos responsables de esta serie de cambios en el patrón de IGFBPs. El incremento de la capacidad de respuesta de la rata neonatal a la acción de GH, que, como se ha comentado antes, se cree responsable del incremento de los niveles de IGF-I que sucede en esta etapa, podría intervenir también en el incremento de los niveles de IGFBP-3. No obstante, Albiston y Herington (75) no observan alteraciones importantes en el mRNA de IGFBP-3 en hígado y riñón entre la 3ª y la 4ª semana postnatal (y posteriormente), a diferencia de lo que sucede en el mRNA de IGF-I, que aumenta paralelamente a sus niveles circulantes. Los cambios observados en los niveles circulantes de IGFBP-3 no se corresponden, por tanto, con los niveles de mRNA hepático, lo que sugiere que la regulación de esta IGFBP tiene lugar a nivel postranscripcional. En esta línea, Domené y cols. (329) han descrito que el mRNA de IGFBP-3 es menos sensible a GH que el de IGF-I en rata joven.

Todos estos cambios pudieran guardar alguna relación con el proceso de diferenciación que acompaña a la transformación del hígado fetal en adulto, y que supondría una serie de procesos de inducción y represión de genes. La insulina tiene un efecto claro en la regulación de IGFBP-1, y también parece intervenir en la de IGFBP-2 (Ver 1.1.3.5.1. y 1.1.3.5.2.). Es posible que esta hormona intervenga en la regulación de la expresión de los genes de ambas postnatalmente. De hecho, nuestros resultados muestran una buena correlación negativa ( $r = -0,88$ ) entre los niveles de insulina y los de la IGFBP de 30 kDa (constituida por una mezcla de IGFBP-1 y 2, pero sobre todo esta última) en los neonatos control (Tabla 3.10.).

#### **4.4.2. Efectos de la subnutrición y la diabetes sobre IGF-I y II en periodo neonatal.**

Tanto las ratas subnutridas como las diabéticas en etapa neonatal presentaron un peso corporal inferior al de sus controles, diferencia que fue más destacada con la subnutrición (Fig. 3.16.). En ambas situaciones los niveles de IGF-I en suero eran inferiores a los de los animales control en los tres estadios estudiados (8, 14 y 22 días), en mayor cuantía en los subnutridos (70-90%) que en los diabéticos (40-60%) (Figura 4.1.).

En la diabetes inducida por STZ en la rata se había descrito también una detención del crecimiento junto con niveles bajos de IGF-I en la circulación (231, 330, 331) y de su mRNA en hígado y otros tejidos (33, 39, 99, 216), así como de su producción hepática (250). Un trabajo reciente (332) indica que en la rata diabética por STZ la regulación del gen de IGF-I tiene lugar a nivel transcripcional.

El descenso en los niveles de IGF-I que encontramos con nuestro modelo de subnutrición se ha comprobado en diversos modelos de restricción alimentaria, especialmente en modelos de ayuno y de restricción proteica, en etapa posterior al destete. La rata sometida a ayuno experimenta una marcada reducción en los niveles séricos de IGF-I (37) que se acompaña a su vez de un descenso en los niveles de su mRNA en hígado (212) y otros órganos (213), y de la tasa de transcripción del gen de IGF-I (214), lo que parece indicar que el mecanismo de la reducción de los niveles de péptido es transcripcional. Las ratas sometidas a restricción proteica muestran también, además de un retardo del crecimiento, una reducción en los niveles séricos de IGF-I (38), junto con un descenso en la cantidad de su mRNA en hígado (102, 215, 216) y en músculo esquelético (217). Esto sugiere que, análogamente a como sucede en el ayuno, las alteraciones tienen lugar a nivel pretraduccional, bien en la transcripción, bien en la estabilidad del mRNA, aunque algunos datos apuntan también una alteración a nivel traduccional (218). No sólo las cantidades de proteína aportadas en la dieta, sino también la calidad nutricional de estas repercute sobre los niveles circulantes y la abundancia del mRNA (en concreto de determinadas especies) de IGF-I (333, 334). Además de estar disminuida la producción de IGF-I se ha comprobado que existe un aclaramiento más rápido de IGF-I del suero (219). En un modelo similar al nuestro, consistente en una reducción del 50% del aporte de alimento a la madre lactante desde el día del parto, Donovan y cols. (229) encuentran una reducción en los niveles de IGF-I desde el día 12 de vida, pero no determinan los niveles de su mRNA en tejidos. En nuestro laboratorio se está llevando a cabo en la actualidad la determinación de la expresión del gen de IGF-I para averiguar si las alteraciones encontradas en los modelos estudiados por nosotros se corresponden también con un descenso en los niveles de mRNA.

Resultados previos en nuestro modelo de subnutrición han mostrado un descenso en los niveles circulantes y en el contenido hipofisario de GH (258). Harel y Tannenbaum (327) han descrito una reducción en la amplitud de los pulsos de secreción de GH, así como en el contenido hipofisario de GH en un modelo de restricción proteica en la rata. En esta misma especie la diabetes mellitus, tanto espontánea (rata BB/W) como provocada por la administración de STZ, se acompaña de hiposecreción de GH, con pérdida de los pulsos de secreción (335) y descenso en la síntesis y contenido hipofisario de esta hormona (336, 328). Tanto en la subnutrición como en la diabetes por STZ estas alteraciones parecen tener su origen, a su vez, en un trastorno del equilibrio entre las hormonas hipotalámicas



inhibidoras y estimuladoras de la síntesis y liberación de GH (327, 328), aunque los mecanismos a través de los cuales se produce este trastorno son desconocidos.

Estas alteraciones descritas en la secreción de GH podrían ser la causa, o una de las causas, de los bajos niveles de IGF-I que caracterizan a la subnutrición y a la diabetes por STZ en la rata. Sin embargo, la situación descrita en el humano es bien distinta. En pacientes con diabetes mellitus tipo 1 no controlada los niveles de GH en plasma están elevados, y se acompañan de un aumento de la secreción episódica y relacionada con el sueño, así como de respuestas exageradas a diversos estímulos (252). En niños malnutridos y en pacientes con anorexia nervosa se han encontrado niveles elevados de GH (210). Tanto en la diabetes como en la subnutrición en humano los niveles de IGF-I son bajos (32, 210, 249), lo que sugiere que en ambas situaciones se produce una resistencia a la acción de GH.

Esta resistencia a la acción de GH se ha comprobado también en modelos experimentales de restricción alimentaria y de diabetes en rata. En el ayuno la resistencia a GH parece estar ocasionada por un descenso del número de receptores de GH (37) y de la abundancia del mRNA de este receptor (214). En la restricción proteica la unión de GH a su receptor está sólo ligeramente reducida (38) pero la respuesta de IGF-I sérico al tratamiento con GH está notablemente disminuida, ya que se requieren dosis farmacológicas de esta hormona para recuperar los niveles normales de mRNA hepático de IGF-I (218); parece, por tanto, que el mecanismo de la resistencia a GH es postreceptorial, y no se debe a una reducción del número de receptores (220, 221). En la rata diabética la GH no induce la expresión del gen de IGF-I ni restablece el crecimiento (33, 251), pero no está claro el mecanismo que media esta resistencia, ya que se han descrito tanto un descenso del número de receptores hepáticos (231) como un defecto postreceptorial (216, 230). Por consiguiente, parece que en el descenso de los niveles de IGF-I en la rata, subnutrida o diabética, concurren tanto una menor secreción de GH como una resistencia de los tejidos periféricos (principalmente el hígado) a su acción. Los mecanismos exactos que median ambos fenómenos no han sido aclarados todavía. Olchovsky y cols. (337) han encontrado un incremento en el contenido de IGF-I hipofisario (sin cambios en la expresión del gen) en ratas diabéticas por STZ, que revirtió tras el tratamiento con insulina, y que, por mecanismos auto o paracrin, ejercería un efecto de retroalimentación negativa sobre la secreción de GH (338). Por el contrario, tras un ayuno de 72 horas, estos mismos autores (232) encuentran un incremento en el contenido de IGF-I hipofisario (sin cambios tampoco en la expresión del gen). Estos datos ponen de manifiesto la complejidad de la regulación del eje GH-IGF-I y las importantes lagunas de conocimiento que existen al respecto.

Dado que, como se acaba de comentar, en ambos modelos, subnutrición y diabetes, se produce un descenso en los niveles de GH, esta situación nos parece idónea para

profundizar en el estudio del papel de la insulina en la secreción. Como hemos visto podido comprobar, en ambos modelos los niveles de insulina en el suero son bajos con respecto a los que presentan las ratas control (Tabla 3.7.). Esta hipoinsulinemia pudiera estar también relacionada con la baja concentración de IGF-I en el suero. Se ha descrito que la insulina tiene un efecto directo sobre la liberación de IGF-I por el hígado en experimentos *in vitro* (28-30). En este sentido nosotros hemos encontrado una correlación positiva entre los niveles de IGF-I e insulina en distintos experimentos, tanto en diabetes como en subnutrición, y a distintas edades cuando se comparan poblaciones con marcadas diferencias en ambos parámetros (tablas 3.13., 3.14., 3.19. y 3.20.). Sin embargo, el efecto de la insulina parece estar mediado por o requerir la presencia de algún otro factor, probablemente relacionado con el estado nutricional, como sugiere un trabajo de Scott y Baxter (250). Estos autores han observado un descenso en la producción de IGF-I por hepatocitos de rata diabética, que mejoró tras el tratamiento del animal con insulina durante 4 días. Sin embargo, el tratamiento de estos hepatocitos con insulina no aumentó la liberación de IGF-I (a diferencia de lo que se observó en hepatocitos de rata no diabética) aun en presencia de GH.

Por lo que respecta a IGF-II, sólo con el modelo de diabetes por STZ hemos encontrado alteraciones en los niveles de este péptido en suero, que fueron más bajos que los encontrados en los animales control a 8 y 14 días (Fig. 4.1.). Existen muy pocas referencias en la literatura acerca de la regulación de IGF-II en situaciones como la diabetes o la subnutrición. Hall y cols. (339) encuentran niveles elevados en adolescentes diabéticos, mientras que Merimée y cols. (340, 341) no encuentran cambios en pacientes con diabetes mellitus. Sin embargo, la situación del humano es difícilmente extrapolable a la de la rata, sobre todo lactante, ya que mientras en humano los niveles de IGF-II se mantienen relativamente altos durante toda la vida, en la rata decrecen tras el nacimiento hasta hacerse prácticamente indetectables en el adulto, como se comentó en el epígrafe anterior.

IGF-II se considera, por lo general, mucho menos sensible que IGF-I a las alteraciones del estado nutricional. Davenport y cols. (211) no encuentran cambios en la concentración de IGF-II circulante tras un ayuno de corta duración en la rata. Leaman y cols. (342) no encuentran alteraciones en la abundancia del mRNA de IGF-II en varios tejidos tras tres días de ayuno en el cerdo. Por el contrario, en la rata neonatal Phillips y cols. (224) han descrito un descenso en los niveles de IGF-II en suero, hígado y cerebro tras un ayuno de 24 horas; la concentración de IGF-II en suero se correlacionó linealmente con el aporte calórico administrado intravenosamente. En este modelo, sin embargo, pueden intervenir otros factores derivados del estrés operatorio o factores hormonales consecuentes a la nutrición parenteral (el estudio se efectuó en animal cateterizado) que no han sido evaluados en ese trabajo. Donovan y cols. (229), con el modelo antes comentado,

encuentran niveles de IGF-II en neonatos subnutridos inferiores a los de los controles, pero los cambios son inconsistentes, y el descenso es claro sólo a 15 y 19 días.

Los resultados obtenidos por nosotros en los niveles de IGF-II no parecen conferir a este péptido un papel relevante en las alteraciones del crecimiento que se observan en la subnutrición y la diabetes. La regulación de los niveles de IGF-II en etapa postnatal no se conoce todavía, y son muchas las cuestiones pendientes. La insulinemia no parece estar relacionada de manera clara, ya que a 8 y 14 días la hipoinsulinemia de los neonatos subnutridos es más intensa que la de los controles, sin que en ellos se produzcan alteraciones significativas en los niveles de IGF-II, por lo que cabría pensar que la hiperglucemia de los animales diabéticos esté desempeñando algún papel en esta regulación.

#### **4.4.3. Efectos de la subnutrición y la diabetes sobre las IGFBPs en periodo neonatal.**

El efecto de las situaciones de subnutrición y diabetes sobre las diversas formas de IGFBPs fue distinto según el modelo y la edad de la rata. Junto a alteraciones en la intensidad de las distintas bandas resultantes del análisis mediante "Western ligand blot" (Fig. 4.2.), hay una alteración del patrón ontogénico característico de la rata control. Los cambios observados en el modelo de subnutrición se han comentado en parte en el epígrafe 4.1. de esta discusión, ya que el modelo utilizado en ese estudio fue el mismo. Aquí discutiremos con más detalle estas alteraciones relacionándolas con las que hemos observado en el modelo de diabetes experimental.

Los cambios más llamativos se producen en la banda de 30 kDa, que es la más abundante en periodo neonatal. La intensidad de esta banda se encuentra notablemente incrementada, en cuantía variable, en ambos modelos en los tres estadios estudiados, tanto en valor absoluto (Fig. 3.20.) como relativo (Tabla 3.8. y Fig. 4.2.). Sin embargo, como muestra el análisis mediante "Western immunoblot" (Fig. 3.19.), el origen de este incremento es diferente en la subnutrición y en la diabetes. En la subnutrición se debe, al menos en su mayor parte, a un aumento en la concentración de IGFBP-2 en la circulación, que es más patente a 14 y 22 días. En la diabetes la concentración de esta IGFBP o no está alterada (8 días) o está incluso disminuida (22 días). El incremento observado a 30 kDa en los animales diabéticos se debe a otra forma de IGFBP, probablemente IGFBP-1.

Estos resultados concuerdan bien con los encontrados en la literatura en modelos similares a los estudiados por nosotros. En la rata adulta, tanto en el ayuno (92, 101) como en la restricción proteica y energética (102) se han descrito niveles elevados de mRNA de IGFBP-2 en hígado. Philipps y cols. (224) han descrito un aumento en suero de las IGFBPs de bajo peso molecular tras un ayuno de 24 horas en ratas de 10 días. Donovan y cols. (229), en el modelo de subnutrición en etapa neonatal antes comentado, han

encontrado también un incremento de hasta 2 veces en la IGFBP-2 en suero (determinado por "Western ligand blot"), así como un aumento de los niveles de su mRNA en hígado. Estos mismos autores también encuentran un incremento en los niveles hepáticos del mRNA de IGFBP-1 a partir del día 15 (edad a la que está prácticamente ausente en los controles). Un aumento en la expresión del gen de IGFBP-1 se ha descrito también en situaciones de ayuno y restricción proteica (90, 92). No se poseen datos, sin embargo, sobre la concentración de IGFBP-1 circulante en rata en estas situaciones; en humano, en cambio, se ha descrito un aumento de la concentración en plasma de IGFBP-1 inmunorreactiva tras ayuno breve y en pacientes con anorexia nervosa (84, 343), y en cerdo recién nacido se ha descrito un incremento de esta IGFBP en suero tras un ayuno de 48 horas (344).

En modelos de diabetes por STZ en rata adulta se ha demostrado un incremento en los niveles circulantes (91) y en el mRNA hepático (332) y renal (345) de IGFBP-1, así como un incremento en el mRNA hepático de IGFBP-2 (92, 99). En adultos, aunque no en neonatos, hemos encontrado niveles más elevados de IGFBP-2, con respecto a la rata control, a los 7 días de la administración de STZ (Fig. 3.30.). Sin embargo, Unterman y cols. (91) no encuentran cambios en rata adulta, si bien es cierto que el estudio de estos autores está efectuado a los tres días de la inyección de STZ.

Estos resultados, y otros que se han resumido en la introducción (Ver 1.1.3.5.1. y 1.1.3.5.2.), parecen indicar que tanto el estado nutricional como el hormonal (fundamentalmente la insulina) intervienen en la regulación de las IGFBPs de 30 kDa, bien IGFBP-1, bien IGFBP-2, aunque la influencia de ambos es distinta. Como hemos visto (Fig. 3.19.), en la subnutrición el efecto más claro se produce sobre IGFBP-2, mientras que en la diabetes por STZ es sobre IGFBP-1.

Los niveles de IGFBP-3 (bandas de 40-50 kDa) fueron inferiores a los controles en los animales subnutridos a 14 y a 22 días. La situación es análoga a la que sucede en el animal adulto tras restricción alimentaria de distinto tipo, tanto ayuno como restricción proteica (107) o proteico-energética (nuestro resultado, Fig. 3.26.). Donovan y cols. (229), sin embargo, no detectan IGFBP-3 en el suero de ratas neonatales en su estudio, que se prolonga hasta el día 19, probablemente por razones de tipo metodológico, aunque sí observan que a 19 días no se produce, en las ratas subnutridas, el incremento en los niveles hepáticos del mRNA de IGFBP-3 característico de los controles. La explicación del descenso en los niveles de IGFBP-3 en la rata subnutrida quizá haya que buscarla en el descenso en los niveles de IGF-I. En la rata diabética el descenso en los niveles de IGF-I no pareció lo suficientemente intenso como para provocar a su vez un descenso en los niveles de IGFBP-3 circulante (Fig. 4.2.). Hay que hacer, no obstante, la observación de que, a pesar de la sensibilidad de la medición densitométrica, una baja relación señal/ruido, como sucede a 8 y 14 días en estas bandas, puede dar lugar a errores de

cuantificación. En todo caso, los cambios más claros en esta IGFBP en diabetes por STZ se observaron en los animales adultos (Fig 3.30.), con un descenso en sus niveles, como ya había sido descrito tanto en rata (51) como en humano (104).

Finalmente, por lo que respecta a la banda de 24 kDa (probablemente IGFBP-4), las alteraciones obtenidas por nosotros en el "Western ligand blot" no muestran cambios consistentes a la hora de analizar los tres estadios estudiados, ya que encontramos, en comparación con los controles (en tanto por ciento con respecto al total de IGFBP), niveles más bajos a 8 y 14 días en los neonatos subnutridos y diabéticos, mientras que a 22 días no hay diferencias entre las poblaciones (Fig. 4.2.). Por comparación con los resultados obtenidos en los experimentos de realimentación y tratamiento con insulina cabría concluir que la subnutrición se acompaña de un descenso en la intensidad de esta banda (Fig. 3.27.), mientras que en la diabetes no se producen cambios (Fig. 3.31.), lo que apunta a una regulación por el estado nutricional. Los conocimientos que se poseen sobre esta IGFBP son escasos; se desconoce el patrón ontogénico en suero y tejidos, y los factores que intervienen en su producción, por lo que serán necesarios más estudios para averiguar el papel de los nutrientes en su regulación.

#### **4.4.4. Efectos de la subnutrición y la diabetes sobre los receptores de IGF en periodo neonatal.**

A fin de investigar la participación de los receptores de IGF (bien por cambios en su capacidad de ligamiento, bien por cambios en su afinidad por el ligando) en las alteraciones observadas en los modelos de subnutrición y diabetes estudiados en este trabajo, procedimos al estudio del ligamiento específico de IGF-I y II a preparaciones de membranas de hígado y cerebro.

En las tres poblaciones estudiadas por nosotros (Tabla 3.9.) el ligamiento específico de IGF-I a membranas de cerebro, y sobre todo hígado, en etapa postnatal fue muy bajo; en este último el ligamiento a 14 y 22 días no difirió del ligamiento inespecífico. El ligamiento de IGF-II en hígado y cerebro fue inferior al observado en etapa fetal, y en hígado descendió progresivamente a lo largo del periodo neonatal. Este patrón ontogénico ya había sido descrito previamente en la rata. Tanto la expresión del receptor tipo I (180), como la del receptor tipo II (191) son máximas en los tejidos en etapa fetal, y descienden postnatalmente hasta los niveles del adulto.

El papel de los receptores de los IGFs en la regulación de las acciones de estos péptidos en situaciones como la subnutrición o la diabetes ha sido muy poco estudiado. Algunos trabajos (213, 232) han descrito, en rata ayunada, un incremento del ligamiento específico de IGF a diversos órganos (pulmón, testículo, estómago, riñón, corazón, hipófisis) que tienen su origen en un aumento de la concentración de receptores y de la

expresión de su gen. En un modelo de restricción proteica se ha descrito también un incremento en el ligamiento de IGF-I a membranas de músculo esquelético (233). Hochberg y cols. (346) han observado un aumento en el ligamiento específico de IGF-I a membranas de eritrocitos en pacientes con anorexia nervosa, aparentemente debido a un aumento en la constante de alta afinidad de este receptor.

En el modelo de diabetes por STZ Werner y cols. (235) han hallado un aumento en el ligamiento específico de IGF-I y en la expresión del gen del receptor tipo I. En ambas situaciones, subnutrición y diabetes, este incremento del ligamiento de IGF-I se ha interpretado como un fenómeno de "up-regulation" secundario a los bajos niveles de IGF-I circulantes o tisulares, sin olvidar tampoco que la hipopinsulinemia que caracteriza a ambas situaciones puede desempeñar algún papel en este fenómeno (234).

Una explicación posible de la ausencia de cambios en el receptor tipo I en cerebro puede residir en la propia complejidad de este órgano, en el que quizá sería más conveniente efectuar un estudio por regiones. Olchovsky y cols. (232), por ejemplo, no encuentran alterada ni la capacidad de unión ni el mRNA en hipotálamo tras un ayuno de 72 horas en rata. En cambio, Bohanon y cols. (347) describen un aumento del número de receptores tipo I en la eminencia media tras 14 días de restricción alimentaria. No obstante, la disparidad de resultados podría muy bien deberse a diferencias entre los distintos modelos de subnutrición. Sería conveniente, en un futuro, estudiar el estado de los receptores en órganos como riñón o músculo en ambos modelos.

Más escasos son aún los trabajos sobre el receptor tipo II en situaciones de subnutrición o diabetes. En nuestro trabajo hemos encontrado un descenso del ligamiento específico de IGF-II a membranas de hígado de ratas subnutridas de 8, 14 y 22 días, y un aumento en ratas diabéticas de 8 y 14 días. Estas alteraciones parecen debidas a cambios en la capacidad de ligamiento más que a alteraciones de la afinidad del receptor, ya que el análisis de Scatchard no mostró cambios significativos entre las  $K_a$  de las distintas preparaciones. Por el contrario, no hemos observado alteraciones en el ligamiento de IGF-II a preparaciones de membranas de cerebro. En este caso la explicación podría ser la misma que la que anotamos para el receptor tipo I: la distribución regional del receptor tipo II en el cerebro. No existe, que sepamos, ningún trabajo en el que se haya abordado el estudio de este receptor en modelos de subnutrición.

La única referencia al estado del receptor tipo II en un modelo de diabetes por STZ en rata procede del trabajo de Werner y cols. (255). Estos autores encuentran un incremento de la expresión y el ligamiento del receptor tipo II en riñón, resultado que está en la línea del encontrado por nosotros en hígado.

Nuestros resultados sugieren una distinta regulación de este receptor en hígado en situaciones de subnutrición y diabetes, aunque no están claros los mecanismos subyacentes. El receptor tipo II no se regula por ligando (9). La insulina, en cambio, se ha descrito que provoca un aumento del número de receptores en la membrana de adipocitos y células de hepatoma H-35 (123), por lo que el fenómeno contrario (la hipoinsulinemia) podría explicar los cambios observados en la subnutrición, pero no en la diabetes. En esta última podría desempeñar algún papel el estado metabólico (hiperglucemia). Hay que hacer la observación, no obstante, de que estos experimentos sobre el papel de la insulina en la regulación del receptor tipo II se han efectuado *in vitro*, por lo que la situación no se corresponde totalmente con la que tiene lugar *in vivo*, donde intervienen otros muchos factores.

No está tampoco claro el papel fisiológico de estos cambios, quizá orientados a un distinto efecto en los procesos de remodelación de tejidos en el contexto del estado catabólico que caracteriza a la subnutrición y a la diabetes por STZ.

#### **4.4.5. Interrelaciones entre IGF-I, IGFBP-30 kDa y crecimiento. Papel de la insulinemia y la glucemia.**

Aunque en ambos modelos se produce una reducción del peso corporal y los niveles de IGF-I, la distinta situación endocrino-metabólica podría explicar a su vez la distinta regulación de las IGFBPs y, por consiguiente, la distinta modulación por éstas de los efectos de los IGFs sobre el crecimiento. En las tres poblaciones de ratas estudiadas el peso se correlaciona con los niveles de IGF-I (Tabla 3.10.). Esta correlación es especialmente buena en las poblaciones control y subnutrida, en las cuales además hay buena correlación entre el peso corporal y la insulinemia. Ello sugiere que la alteración del crecimiento que se produce en los animales diabéticos está mediada por un mecanismo distinto del que opera en los subnutridos. En las tres poblaciones el peso corporal se correlaciona inversamente con los niveles de la banda de IGFBP de 30 kDa, con  $r$  entre -0,84 y -0,89. Sin embargo, mientras que en los animales subnutridos y controles la intensidad de esta banda se correlaciona inversamente con la insulinemia, en los diabéticos se correlaciona inversamente con la glucemia. Todo ello parece indicar que la naturaleza de la IGFBP de 30 kDa que provoca la elevación en la intensidad de esta banda es distinta en los animales subnutridos que en los diabéticos, resultado que está de acuerdo con lo observado en el análisis mediante "Western immunoblot" (Fig. 3.19.).

La situación de hiperglucemia en los animales diabéticos parece prevenir el descenso en los niveles de IGF-I, pero impide su acción sobre el crecimiento, lo cual explicaría la peor correlación entre el peso corporal y los niveles de IGF-I sérico en estos animales. Phillips y cols. (348) habían descrito la presencia, en suero de ratas diabéticas por STZ, de un inhibidor de la actividad somatomedina (determinada por bioensayo), con un peso

molecular de aproximadamente 30 kDa, y cuyos niveles se correlacionaban con los niveles de glucemia y con la pérdida de peso que se producía en los animales. Una correlación positiva muy buena entre la glucemia y los niveles de la IGFBP de 30 kDa se observó en neonatos de 21 días (se obvia, por tanto, el efecto de la edad en los niveles de esta IGFBP) controles, diabéticos y tratados con insulina, en un rango amplio de glucemias (Tabla 3.19.). Por otro lado, Taylor y cols. (254) han propuesto que la BP-28 (que corresponde a IGFBP-1 en la nomenclatura actual) es, al menos, uno de los inhibidores observados en el suero de pacientes diabéticos. Los primeros estudios llevados a cabo en niños malnutridos describían la presencia de inhibidores de IGF en el suero (210). Como en el caso de la diabetes, estos inhibidores representan probablemente IGFBPs; en concreto, en el caso de la malnutrición, IGFBP-2 que, como ya se ha comentado, se encuentra elevada en situaciones de restricción alimentaria, y en el caso de la diabetes con toda probabilidad IGFBP-1.

Parece claro, por tanto, que las IGFBPs de bajo peso molecular tienen un papel relevante en el retardo de crecimiento que se produce en las situaciones de diabetes y subnutrición en etapa neonatal. Como ya se adelantó en la Introducción (1.3.6.), el efecto predominante de las IGFBPs *in vitro* es inhibidor de las acciones de IGF. La reducción en los niveles de IGF-I, junto con un aumento en las IGFBPs de bajo peso molecular, resultaría en la limitación del crecimiento, de manera que los nutrientes, por medio de su papel regulador de la secreción de IGF-I y sus proteínas ligadoras, serían utilizados preferentemente para el metabolismo energético.

En resumen, la etapa lactante, en la que se ha centrado esta parte de nuestro trabajo, constituye un periodo de transición a los mecanismos reguladores del crecimiento propios del adulto, con cambios característicos en los niveles de IGFs y en el patrón de formas de IGFBPs. La subnutrición y la diabetes provocan, en periodo neonatal, un retardo del crecimiento aparentemente por mecanismos similares (descenso de los niveles de IGF-I e incremento de las IGFBPs de 30 kDa), si bien en ambas situaciones la regulación de las distintas especies de IGFBPs se jerce de diferente manera.

#### **4.5. Efectos de la realimentación y el tratamiento sustitutivo con insulina**

Las diferencias encontradas en los niveles de IGF-I en ratas subnutridas y diabéticas en periodo neonatal (con un descenso proporcionalmente mayor en la subnutrición que en la diabetes) y, sobre todo, las correlaciones que se establecen entre el peso corporal, los niveles de IGF-I circulante y los niveles de IGFBPs en suero (determinados mediante "Western ligand blot") discutidas en el apartado anterior sugieren que circunstancias distintas intervienen en la regulación del retardo del crecimiento y de la elevación concomitante de los niveles de la IGFBP de 30 kDa en ambas poblaciones. Como ya se ha comentado en el apartado anterior, todo apunta a que estas circunstancias pueden ser



la insulina y/o el estado nutricional. Tanto en el modelo de subnutrición como en el de diabetes por STZ en etapa neonatal la insulinemia fue baja con respecto a la rata control, pero la glucemia estaba reducida en los animales subnutridos y muy elevada en los diabéticos (Tabla 3.7.).

Estas circunstancias, junto con los cambios tan marcados que se producen en el patrón de bandas de IGFbps y en los niveles de IGFs entre el periodo fetal y el adulto (Figuras 4.1., 4.2. y 3.4.) nos sugirieron la realización de experimentos de rehabilitación en ambos modelos tanto en rata lactante como en rata adulta. Generalmente los experimentos de realimentación o tratamiento sustitutivo con insulina descritos en la literatura se han llevado a cabo, de manera muy limitada, como complemento de los estudios de restricción alimentaria o diabetes. En modelos de restricción proteica o proteico-energética, por ejemplo, la atención se ha centrado fundamentalmente en el estudio del efecto de diversos aspectos cualitativos (tipo de proteínas suministradas) o cuantitativos sobre los niveles de IGF-I (208). Por otra parte, varios trabajos en modelos de subnutrición o diabetes se han dirigido a estudiar los efectos de la administración de IGF-I sobre aspectos como el crecimiento y el balance de nitrógeno (226, 349).

En este trabajo los estudios de rehabilitación en rata subnutrida se realizaron realimentando ratas subnutridas (desde el día 16 de gestación), tanto adultas como lactantes (de 8 días) durante un periodo de 6 días. Paralelamente se trató con insulina durante un periodo de 5 días, a ratas, tanto adultas como lactantes (de 14 días) a las que se había provocado un cuadro de diabetes mellitus mediante la administración de STZ tres días antes. Con estos experimentos se trataba de establecer la eficacia la insulina y los nutrientes en la normalización del peso corporal y los niveles de IGF-I y sus proteínas ligadoras, y comparar los efectos obtenidos en etapa lactante y adulta, etapas en las cuales difieren tanto los requerimientos de nutrientes como la composición de la dieta que reciben los animales. No conocemos ningún trabajo en el que se haya empleado este abordaje experimental en el estudio de la interacción de la insulina y los nutrientes en la regulación de los IGFs y sus proteínas ligadoras mediante la comparación de las dos situaciones, subnutrición y diabetes, que estamos analizando.

En periodo neonatal tanto la realimentación de los animales subnutridos (Fig. 3.24.) como la administración de insulina a los diabéticos (Fig. 3.28.) se acompañó de una recuperación del peso corporal de las ratas control, pero sólo en las ratas tratadas con insulina hubo una recuperación de los niveles de IGF-I en suero. En ambos casos los niveles de insulina en las ratas realimentadas o tratadas fueron significativamente más altos al final del experimento que los de las ratas control. Esta hiperinsulinemia en las ratas realimentadas, junto con la mayor capacidad de recuperación de las tasa de crecimiento característica de los periodos de inmadurez, podría explicar en parte la recuperación del peso a pesar de no alcanzar valores de IGF-I similares a los de las ratas control. Por otro

lado, la insulinemia proporcionalmente más alta (con respecto a los controles) en los neonatos tratados con insulina que en los realimentados podría propiciar una mayor síntesis y liberación de IGF-I que explicaría la recuperación de los niveles de este péptido debida al tratamiento con insulina. Como hemos comprobado en los experimentos de rehabilitación, la correlación entre los niveles de IGF-I e insulina fue buena en todos los casos (Tablas 3.13, 3.14., 3.19. y 3.20.). En relación con esto, se ha comentado ya el papel de la insulina en la síntesis y liberación de IGF-I (28-30).

La rata adulta realimentada contaba, al final del experimento, con niveles de insulina comparables a los del animal control. Sin embargo, el periodo de realimentación no pareció suficiente para recuperar el peso y los niveles de IGF-I que presentaba la rata control (Fig. 3.24.). En la rata adulta diabética el tratamiento con insulina produjo unos efectos similares a los observados en rata neonatal, con recuperación del peso y los niveles de IGF-I en suero, e insulinemia más alta que la de las ratas control (Fig. 3.28.). Cabe pensar que en este caso, análogamente a lo observado en neonatos rehabilitados, la hiperinsulinemia de las ratas tratadas con esta hormona es responsable de la recuperación de los niveles de IGF-I y del peso; en este último parámetro hay que contar también con un posible mayor acúmulo de grasa propiciado por la insulina.

En modelos en rata de realimentación tras ayuno se han observado una recuperación de los niveles de IGF-I (212) y regeneración en el mRNA de IGF-I (212, 214). El grado de recuperación depende de la duración del ayuno y de la realimentación. Se ha observado también una regeneración de los niveles de GH (90) y del mRNA del receptor de GH (214). Donovan y cols. (219) han estudiado el efecto de la realimentación en ratas lactantes entre los días 15 y 19 tras una restricción alimentaria de un 50% desde el nacimiento. Se trata del único trabajo de estas características efectuado en periodo neonatal. Estos autores observan una recuperación de los niveles de IGF-I (con respecto a la rata control), aunque no del peso corporal. El dato más llamativo del análisis de las IGFBPs del suero mediante "Western ligand blot" fue una recuperación de los niveles de IGFBP-2, que estaban elevados en la rata subnutrida. Este resultado es concordante con el obtenido por nosotros en la banda de 30 kDa (Fig. 3.27.). Las diferencias entre los resultados obtenidos por estos autores y los obtenidos por nosotros estriban tal vez en el modelo de subnutrición, aunque hay que considerar también que la realimentación comienza a edades distintas en ambos.

Se ha observado también una ganancia de peso y una recuperación en los niveles de IGF-I tras tratamiento con insulina en ratas diabéticas por STZ (350). Sin embargo, la literatura ofrece una amplia variedad de modelos que tiene su origen en diferencias en la duración e intensidad de la diabetes previa al tratamiento, la duración y dosis del mismo, así como el tipo de insulina empleado; todo ello hace dificulta la comparación de nuestros resultados con los ofrecidos por la literatura. En todo caso, se admite que el tratamiento

con insulina, además de una ganancia de peso y un incremento de los niveles de IGF-I circulante (350), una recuperación de los niveles del mRNA hepático de IGF-I (99, 332) y de los niveles de GH en suero e hipófisis (336).

Los cambios observados en las IGFBPs en los animales subnutridos y diabéticos de estos experimentos ya han sido discutidos en el apartado anterior, en el que se hacía referencia también a resultados obtenidos en la rata adulta. Creemos conveniente, sin embargo, hacer una puntualización relativa a la interpretación del análisis de las IGFBPs del suero mediante "Western ligand blot", especialmente en la rata adulta. Así, mientras que en el suero de rata neonatal se observa un incremento en la intensidad de la banda de 30 kDa tanto en la subnutrición como en la diabetes, incremento debido, por otro lado, al aumento de los niveles de distintas formas de IGFBPs en una u otra situación, como ya se ha comentado (4.4.3.), en la rata adulta se observa, en el análisis mediante "Western ligand blot", un descenso en la intensidad de las dos bandas que se detectan en la región de 30 kDa (en concreto 28 y 30 kDa) (Figs. 3.27. y 3.31.). Este resultado contrasta con el incremento que se aprecia, también en rata adulta, en IGFBP-2 detectada mediante "Western immunoblot" (Figs 3.26. y 3.30.) en las situaciones de subnutrición y diabetes por STZ, a lo que hay que añadir el incremento en la concentración de IGFBP-1 que se ha descrito en el suero de rata diabética (91) y que probablemente se produce también en la rata subnutrida (90, 92, 344), cambios todos estos que no detectamos mediante "Western ligand blot". En este sentido Crawford y cols. (296), por ejemplo, observan cambios similares a los obtenidos por nosotros en rata adulta ayunada durante 54 horas, empleando también "Western ligand blot". Todas estas observaciones explican también el que las correlaciones entre la intensidad de la banda o bandas de 30 kDa y diversos parámetros (como peso corporal, glucemia, insulinemia) sea de signo distinto en neonatos y adultos, tanto en el modelo de realimentación (Tablas 3.13. y 3.14.) como en el de tratamiento sustitutivo con insulina (Tablas 3.19. y 3.20.).

Como se señaló al principio de esta Discusión (4.1.), las bandas que se observan en torno a 30 kDa representan, probablemente, diversas formas de IGFBPs con un peso molecular aparente muy similar, para cuya identificación es necesario, por tanto, combinar diversos métodos de análisis. Así, la combinación de "Western ligand blot" y "Western immunoblot" nos ha permitido la identificación de IGFBP-2 en este trabajo. No hay que perder de vista tampoco las limitaciones metodológicas del "Western ligand blot". El hecho de que se precise someter la muestra a condiciones drásticas para su desnaturalización parcial antes de la electroforesis puede muy bien alterar las propiedades de unión de la IGFBP a IGF. Esto explicaría que un incremento en determinadas IGFBPs observado con métodos inmunológicos no se observe con "ligand blot". Los niveles de IGFBP-1 y 2 en la rata adulta son de por sí muy bajos (174), con lo que quizá los cambios hayan de ser muy marcados para poder ser detectados mediante "ligand blot".

Las alteraciones más destacadas que se observan en el análisis mediante "Western ligand blot", tanto en subnutrición como en diabetes, son el descenso en la intensidad de las bandas de 40-50 kDa (IGFBP-3) en neonatos y en adultos (pero sobre todo en adultos) y el incremento de intensidad de las bandas en torno a 30 kDa en neonatos (Figs. 3.27. y 3.31.). Tal como sucedía en adultos subnutridos con respecto a IGF-I, la IGFBP-3 no alcanza los valores de los animales controles después de la realimentación, y sí los alcanzan los diabéticos después de recibir insulina. Esto parece conceder a esta hormona un papel regulador tanto de IGF-I como IGFBP-3 en periodo adulto. El papel de la insulina sería en todo caso indirecto, probablemente a través del aumento correspondiente en los niveles de GH, que, como ya hemos comentado, tiene lugar tras el tratamiento con insulina, aspecto que estamos tratando de aclarar con determinaciones de GH en suero en estos experimentos, ya que además se ha descrito ampliamente que tanto IGF-I como IGFBP-3 dependen de GH en periodo adulto (14, 69).

Por otra parte, el aumento de intensidad en la banda de 30 kDa que se observa en etapa neonatal tanto en subnutrición como en diabetes (Figs. 4.2., 3.27. y 3.31.) se revierte también tras realimentación y tratamiento con insulina. En este último caso a niveles inferiores incluso a los observados en la rata control, efecto este quizá de la hiperinsulinemia relativamente más marcada en los neonatos tratados con insulina que en los realimentados (Figs. 3.24. y 3.28.). Como ya se comentó en el apartado anterior, y así ratifican los resultados de las figuras 3.25. y 3.29., los cambios en esta banda de 30 kD parecen deberse a formas diferentes de IGFBP (una de ellas IGFBP-2) cuya regulación por insulina y nutrientes muestra características diferentes.

Para evaluar la hipótesis de si los nutrientes realmente son más decisivos que la insulina en el descenso de IGF-I que provoca la subnutrición, realizamos el último experimento de este trabajo, consistente en la rehabilitación con insulina y alimento, o sólo con insulina, de ratas subalimentadas durante 7 días y a las que además se provocó un cuadro de diabetes mellitus con STZ. En la figura 3.33. y en la tabla 3.21. puede observarse que en los animales que fueron realimentados y recibieron insulina (población RD+I), el peso aumenta por encima de los animales subnutridos (población S), mientras que los animales que sólo recibieron insulina (población SD+I) conservaron su peso durante el periodo de tratamiento, tendencia similar a la observada en las ratas subnutridas durante el mismo periodo de tiempo. En este importante aumento de peso que experimentan las ratas de la población RD+I podría intervenir de manera destacada la insulina, cuyos niveles están notablemente elevados, favoreciendo los procesos anabólicos y el aprovechamiento de los nutrientes de que disponen *ad libitum* estas ratas. En efecto, aunque las ratas de la población SD+I presentan unos niveles de insulina similares a los de la rata control, la falta de nutrientes les impide ganar peso.

Como puede observarse en la figura 3.4., los niveles de IGF-I están enormemente reducidos cuando la diabetes se superpone a la situación de subnutrición, pero la corrección de la diabetes mediante la administración subsiguiente de insulina a estos animales sólo provoca un ligero incremento en los niveles de IGF-I, que son similares a los de las ratas solamente subnutridas. Por el contrario, cuando al efecto del tratamiento con insulina se le añade el efecto de la realimentación el resultado es un claro aumento de la concentración de IGF-I. No obstante, la insulina administrada durante cinco días, en una diabetes provocada de tres días antes, no parece suficiente para restaurar por completo los niveles de IGF-I o IGFBPs.

Por lo que respecta a las IGFBPs del suero analizadas mediante "Western ligand blot", cabe hacer similares observaciones a las anotadas para el peso y los niveles de IGF-I. La subnutrición provocó un descenso en la intensidad de todas las bandas consideradas (40-50, 30, 28 y 24 kDa), en tanto que la diabetes sobreañadida no provocó mayor alteración en la intensidad de las bandas. Quizá el periodo de diabetes no fue lo suficientemente prolongado como para dejarse notar en las IGFBPs; en este aspecto cabe notar la mayor sensibilidad de los niveles de IGF-I a alteraciones del estado nutricional y metabólico. La administración de insulina a estos animales subnutridos y además diabéticos no se acompaña de cambios en las diferentes formas de IGFBPs; sin embargo, tras la realimentación y el tratamiento con insulina se produjo aumento en IGFBP-3 similar (porcentualmente con respecto a los controles) al que se observó en animales adultos subnutridos (no diabéticos) realimentados (Fig. 3.27.B). En las bandas de 28 y 30 kDa se alcanzaron niveles comparables a los de la rata control, análogamente, por otra parte, a lo ya descrito en el experimento de rehabilitación de ratas diabéticas adultas (Fig. 3.31.B); estos cambios podrían deberse a los niveles elevados de insulina que caracterizan estas dos situaciones (Fig. 3.28. y Tabla 3.21.).

Estos resultados parecen otorgar a la falta de nutrientes un papel clave en la regulación de los niveles de IGF-I y sus proteínas ligadoras en los animales subnutridos. La insulina tendría un papel permisivo en el aumento de los niveles de ambos, ya que sólo después de la realimentación es eficaz el tratamiento con insulina para provocar una recuperación en los niveles de IGF-I e IGFBPs en los animales subnutridos y además diabéticos.

El estudio de regresión lineal y correlación efectuado en los experimentos de realimentación y tratamiento con insulina, tanto en periodo neonatal como adulto, muestra una correlación negativa entre la IGFBP de 30 kDa y el peso corporal y la insulinemia en periodo neonatal que es positiva en periodo adulto. Como ya se ha comentado, todo apunta a que la naturaleza de las IGFBPs que observamos en torno a 30 kDa es distinta en neonatos y adultos. Un dato a destacar es que la glucemia en los neonatos del experimento de rehabilitación con insulina (Tabla 3.19.) muestra una correlación positiva muy alta con dicha IGFBP que no se observa en el modelo de realimentación (Tabla 3.13.). Luego si

comparamos con los animales subnutridos, la glucemia parece estar ejerciendo un papel clave en el aumento de la IGFBP de 30 kDa en los animales diabéticos, propiciando el aumento de esta IGFBP. Todo ello resalta el papel importante de la glucemia en las adaptaciones de los animales diabéticos, y apunta a una correlación positiva entre la hiperglucemia y el posible inhibidor de IGF-I sugerido por otros autores en animales diabéticos (254, 348). En efecto, se ha observado una correlación negativa muy buena entre el peso corporal y los niveles de glucemia en estos animales, tanto neonatos (Tabla 3.19.) como adultos (Tabla 3.20.).

En las correlaciones que se establecen en el experimento de realimentación y tratamiento con insulina de ratas subnutridas y además diabéticas (Tabla 3.24) se encuentra un paralelismo con respecto al experimento de realimentación en adultos (Tabla 3.14.). El efecto de la diabetes producida en estos animales se deja ver en algunos parámetros como la distinta correlación entre glucemia, insulinemia e IGFBP de 30 kD o en la no significación en la corelación entre peso de cuerpo e insulinemia.

Como resumen de todo lo anterior, el estudio de las correlaciones entre diversos parámetros muestra, por una parte, que las regulaciones con respecto a IGFs, peso de cuerpo e IGFBPs (especialmente la de 30 kDa) son distintas en periodo neonatal y adulto en ambas situaciones, diabetes y subnutrición; por otra parte, que los mecanismos reguladores en la diabetes difieren sustancialmente de los que intervienen en la subnutrición, y que en dicha diferencia parece desempeñar la hiperglucemia un papel clave.

Estos experimentos de rehabilitación in vivo parecen conferir una gran importancia a los nutrientes como moduladores de los niveles de IGF-I circulante y creemos que son la primera tentativa experimental tratando de establecer la importancia del papel de la insulina y los nutrientes en los dos modelos que venimos comentando. Estos experimentos deberán ser ampliados en el futuro con cuidadosa determinación de los niveles de GH circulante, que ya estamos efectuando. Estos resultados creemos que son un buen indicio experimental que parece conceder a los nutrientes una relevancia en el control de IGF-I ya sugerida reiteradamente en la literatura en modelos de subnutrición. Consideramos, así mismo, que confieren un papel clave a la glucemia en las adaptaciones encontradas en las situaciones de diabetes y subnutrición.

la insulina y/o el estado nutricional. Pero tanto en el modelo de subnutrición como en el de diabetes por STZ en etapa neonatal la insulinemia fue baja con respecto a la rata control, y sin embargo la glucemia estaba reducida en los animales subnutridos y muy elevada en los diabéticos (Tabla 3.7.).

Estas circunstancias, junto con los cambios tan marcados que se producen en el patrón de bandas de IGFBPs y en los niveles de IGFs entre el periodo fetal, neonatal y adulto (Figuras 4.1., 4.2. y 3.4.) nos sugirieron la realización de experimentos de rehabilitación en ambos modelos tanto en rata lactante como en rata adulta. Generalmente los experimentos de realimentación o tratamiento sustitutivo con insulina descritos en la literatura se han llevado a cabo, de manera muy limitada, como complemento de los estudios de restricción alimentaria o diabetes. En modelos de restricción proteica o proteico-energética, por ejemplo, la atención se ha centrado fundamentalmente en el estudio del efecto de diversos aspectos cualitativos (tipo de proteínas suministradas) o cuantitativos sobre los niveles de IGF-I (208). Por otra parte, varios trabajos en modelos de subnutrición o diabetes se han dirigido a estudiar los efectos de la administración de IGF-I sobre aspectos como el crecimiento y el balance de nitrógeno (226, 349).

En este trabajo los estudios de rehabilitación en rata subnutrida se realizaron realimentando ratas subnutridas (desde el día 16 de gestación), tanto adultas como lactantes (de 8 días) durante un periodo de 6 días. Paralelamente se trató con insulina durante un periodo de 5 días, a ratas, tanto adultas como lactantes (de 14 días) a las que se había provocado un cuadro de diabetes mellitus mediante la administración de STZ de tres días antes. Con estos experimentos se trataba de establecer la eficacia de insulina y los nutrientes en la normalización del peso corporal y los niveles de IGF-I y sus proteínas ligadoras, y comparar los efectos obtenidos en etapa lactante y adulta, etapas en las cuales difieren tanto los requerimientos de nutrientes como la composición de la dieta que reciben los animales. No conocemos ningún trabajo en el que se haya empleado este abordaje experimental en el estudio de la interacción de la insulina y los nutrientes en la regulación de los IGFs y sus proteínas ligadoras mediante la comparación de las dos situaciones, subnutrición y diabetes, que estamos analizando.

#### **4.5.1. Efectos de la rehabilitación sobre el peso corporal, la glucemia, la insulinemia y los niveles de IGF-I en neonatos.**

En periodo neonatal tanto la realimentación de los animales subnutridos (Fig. 3.24.) como la administración de insulina a los diabéticos (Fig. 3.28.) se acompañó de una recuperación del peso corporal de las ratas control, pero sólo en las ratas tratadas con insulina hubo una recuperación de los niveles de IGF-I en suero. En ambos casos los niveles de insulina en las ratas realimentadas o tratadas con insulina fueron significativamente más altos al final del experimento que los de las ratas control. Esta

hiperinsulinemia en las ratas realimentadas, junto con la mayor capacidad de recuperación de la tasa de crecimiento característica de los periodos de inmadurez, podría explicar en parte la recuperación del peso a pesar de no alcanzar valores de IGF-I similares a los de las ratas control. Por otro lado, la insulinemia proporcionalmente más alta (con respecto a los controles) en los neonatos tratados con insulina que en los realimentados podría propiciar una mayor síntesis y liberación de IGF-I que explicaría la recuperación de los niveles de este péptido debida al tratamiento con insulina. Como hemos comprobado en los experimentos de rehabilitación, la correlación entre los niveles de IGF-I e insulina fue buena en todos los casos (Tablas 3.13, 3.14., 3.19. y 3.20.). En relación con esto, se ha comentado ya el papel de la insulina en la síntesis y liberación de IGF-I (28-30).

#### **4.5.2. Efectos de la rehabilitación sobre el peso corporal, la glucemia, la insulinemia y los niveles de IGF-I en adultos.**

La rata adulta realimentada contaba, al final del experimento, con niveles de insulina comparables a los del animal control. Sin embargo, el periodo de realimentación no pareció suficiente para recuperar el peso y los niveles de IGF-I que presentaba la rata control (Fig. 3.24.). En la rata adulta diabética el tratamiento con insulina produjo unos efectos similares a los observados en rata neonatal, con recuperación del peso y los niveles de IGF-I en suero, e insulinemia más alta que la de las ratas control (Fig. 3.28.). Cabe pensar que en este caso, análogamente a lo observado en neonatos rehabilitados, la hiperinsulinemia de las ratas tratadas con esta hormona es responsable de la recuperación de los niveles de IGF-I y del peso; en este último parámetro hay que contar también con un posible mayor acúmulo de grasa propiciado por la insulina.

#### **4.5.3. Comentarios sobre el estado del tema en la bibliografía.**

En modelos en rata de realimentación tras ayuno se han observado una recuperación de los niveles de IGF-I (212) y regeneración en el mRNA de IGF-I (212, 214). El grado de recuperación depende de la duración del ayuno y de la realimentación. Se ha observado también una regeneración de los niveles de GH (90) y del mRNA del receptor de GH (214). Donovan y cols. (219) han estudiado el efecto de la realimentación en ratas lactantes entre los días 15 y 19 tras una restricción alimentaria de un 50% desde el nacimiento. Se trata del único trabajo de estas características efectuado en periodo neonatal. Estos autores observan una recuperación de los niveles de IGF-I (con respecto a la rata control), aunque no del peso corporal. El dato más llamativo del análisis de las IGFBPs del suero mediante "Western ligand blot" fue una recuperación de los niveles de IGFBP-2, que estaban elevados en la rata subnutrida. Este resultado es concordante con el obtenido por nosotros en la banda de 30 kDa (Fig. 3.27.). Las diferencias entre los resultados obtenidos por estos autores y los obtenidos por nosotros estriban tal vez en el modelo de subnutrición,



aunque hay que considerar también que la realimentación comienza a edades distintas en ambos.

Se ha observado también una ganancia de peso y una recuperación en los niveles de IGF-I tras tratamiento con insulina en ratas diabéticas por STZ (350). Sin embargo, la literatura ofrece una amplia variedad de modelos que tiene su origen en diferencias en la duración e intensidad de la diabetes previa al tratamiento, la duración y dosis del mismo, así como el tipo de insulina empleado; todo ello hace dificulta la comparación de nuestros resultados con los ofrecidos por la literatura. En todo caso, se admite que el tratamiento con insulina, además de una ganancia de peso y un incremento de los niveles de IGF-I circulante (350), una recuperación de los niveles del mRNA hepático de IGF-I (99, 332) y de los niveles de GH en suero e hipófisis (336).

#### **4.5.4. Efectos de la rehabilitación sobre las IGFBPs en neonatos y adultos.**

Las alteraciones más destacadas que se observan en el análisis mediante "Western ligand blot", tanto en subnutrición como en diabetes, son el descenso en la intensidad de las bandas de 40-50 kDa (IGFBP-3) en neonatos y en adultos (pero sobre todo en adultos) y el incremento de intensidad de las bandas en torno a 30 kDa en neonatos (Figs. 3.27. y 3.31.). Tal como sucedía en adultos subnutridos con respecto a IGF-I, la IGFBP-3 no alcanza los valores de los animales controles después de la realimentación, y sí los alcanzan los diabéticos después de recibir insulina. Esto parece conceder a esta hormona un papel regulador tanto de IGF-I como IGFBP-3 en periodo adulto. El papel de la insulina sería en todo caso indirecto, probablemente a través del aumento correspondiente en los niveles de GH, que, como ya hemos comentado, tiene lugar tras el tratamiento con insulina, aspecto que estamos tratando de aclarar con determinaciones de GH en suero en estos experimentos, ya que además se ha descrito ampliamente que tanto IGF-I como IGFBP-3 dependen de GH en periodo adulto (14, 69).

Por otra parte, el aumento de intensidad en la banda de 30 kDa que se observa en etapa neonatal tanto en subnutrición como en diabetes (Figs. 4.2., 3.27. y 3.31.) se revierte también tras realimentación y tratamiento con insulina. En este último caso a niveles inferiores incluso a los observados en la rata control, efecto este quizá de la hiperinsulinemia relativamente más marcada en los neonatos tratados con insulina que en los realimentados (Figs. 3.24. y 3.28.). Como ya se comentó en el apartado anterior (4.4.3.), y así ratifican los resultados de las figuras 3.25. y 3.29., los cambios en esta banda de 30 kD parecen deberse a formas diferentes de IGFBP (una de ellas IGFBP-2) cuya regulación por insulina y nutrientes muestra características diferentes.

Los cambios observados en las IGFBPs en los animales subnutridos y diabéticos ya han sido discutidos anteriormente (4.4.3.). Creemos conveniente, sin embargo, hacer una

puntualización relativa a la interpretación del análisis de las IGFBPs del suero mediante "Western ligand blot", especialmente en la rata adulta. Como se acaba de exponer, en el suero de rata neonatal se observa un incremento en la intensidad de la banda de 30 kDa tanto en la subnutrición como en la diabetes, incremento que se debe al aumento de los niveles de distintas formas de IGFBPs, como muestra el análisis por "immunoblot". En la rata adulta, por el contrario, se observa, en el análisis mediante "Western ligand blot", un descenso en la intensidad de las dos bandas que se detectan en la región de 30 kDa (en concreto 28 y 30 kDa) (Figs. 3.27. y 3.31.). Este resultado contrasta con el incremento que se aprecia, también en rata adulta, en IGFBP-2 detectada mediante "Western immunoblot" (Figs 3.26. y 3.30.) en las situaciones de subnutrición y diabetes por STZ, a lo que hay que añadir el incremento en la concentración de IGFBP-1 que se ha descrito en el suero de rata diabética (91) y que probablemente se produce también en la rata subnutrida (90, 92, 344), cambios todos estos que no detectamos mediante "Western ligand blot". En este sentido Crawford y cols. (296), por ejemplo, observan cambios similares a los obtenidos por nosotros en rata adulta ayunada durante 54 horas, empleando también "Western ligand blot". Todas estas observaciones explican también el que las correlaciones entre la intensidad de la banda o bandas de 30 kDa y diversos parámetros (como peso corporal, glucemia, insulinemia) sea de signo distinto en neonatos y adultos, tanto en el modelo de realimentación (Tablas 3.13. y 3.14.) como en el de tratamiento sustitutivo con insulina (Tablas 3.19. y 3.20.).

Como se señaló al principio de esta Discusión (4.1.), las bandas que se observan en torno a 30 kDa representan, probablemente, diversas formas de IGFBPs con un peso molecular aparente muy similar, para cuya identificación es necesario, por tanto, combinar diversos métodos de análisis. Así, la combinación de "Western ligand blot" y "Western immunoblot" nos ha permitido la identificación de IGFBP-2 en este trabajo. No hay que perder de vista tampoco las limitaciones metodológicas del "Western ligand blot". El hecho de que se precise someter la muestra a condiciones drásticas para su desnaturalización parcial antes de la electroforesis puede muy bien alterar las propiedades de unión de la IGFBP a IGF. Esto explicaría que un incremento en determinadas IGFBPs observado con métodos inmunológicos no se observe con "ligand blot". Los niveles de IGFBP-1 y 2 en la rata adulta son de por sí muy bajos (174), con lo que quizá los cambios hayan de ser muy marcados para poder ser detectados mediante "ligand blot".

#### **4.5.5. Rehabilitación de ratas adultas subnutridas y diabéticas.**

Para evaluar la hipótesis de si los nutrientes realmente son más decisivos que la insulina en el descenso de IGF-I que provoca la subnutrición, realizamos el último experimento de este trabajo, consistente en la rehabilitación con insulina y alimento, o sólo con insulina, de ratas subalimentadas durante 7 días y a las que además se provocó un cuadro de diabetes mellitus con STZ. En la figura 3.33. y en la tabla 3.21. puede

observarse que en los animales que fueron realimentados y recibieron insulina (población RD+I), el peso aumenta por encima de los animales subnutridos (población S), mientras que los animales que sólo recibieron insulina (población SD+I) conservaron su peso durante el periodo de tratamiento, tendencia similar a la observada en las ratas subnutridas durante el mismo periodo de tiempo. En este importante aumento de peso que experimentan las ratas de la población RD+I podría intervenir de manera destacada la insulina, cuyos niveles están notablemente elevados, favoreciendo los procesos anabólicos y el aprovechamiento de los nutrientes de que disponen *ad libitum* estas ratas. En efecto, aunque las ratas de la población SD+I presentan unos niveles de insulina similares a los de la rata control, la falta de nutrientes les impide ganar peso.

Como puede observarse en la figura 3.4., los niveles de IGF-I están enormemente reducidos cuando la diabetes se superpone a la situación de subnutrición, pero la corrección de la diabetes mediante la administración subsiguiente de insulina a estos animales sólo provoca un ligero incremento en los niveles de IGF-I, que son similares a los de las ratas solamente subnutridas. Por el contrario, cuando al efecto del tratamiento con insulina se le añade el efecto de la realimentación el resultado es un claro aumento de la concentración de IGF-I. No obstante, la insulina administrada durante cinco días, en una diabetes provocada de tres días antes, no parece suficiente para restaurar por completo los niveles de IGF-I o IGFBPs.

Por lo que respecta a las IGFBPs del suero analizadas mediante "Western ligand blot", cabe hacer similares observaciones a las anotadas para el peso y los niveles de IGF-I. La subnutrición provocó un descenso en la intensidad de todas las bandas consideradas (40-50, 30, 28 y 24 kDa), en tanto que la diabetes sobreañadida no provocó mayor alteración en la intensidad de las bandas. Quizá el periodo de diabetes no fue lo suficientemente prolongado como para dejarse notar en las IGFBPs; en este aspecto cabe notar la mayor sensibilidad de los niveles de IGF-I a alteraciones del estado nutricional y metabólico. La administración de insulina a estos animales subnutridos y además diabéticos no se acompaña de cambios en las diferentes formas de IGFBPs; sin embargo, tras la realimentación y el tratamiento con insulina se produjo aumento en IGFBP-3 similar (porcentualmente con respecto a los controles) al que se observó en animales adultos subnutridos (no diabéticos) realimentados (Fig. 3.27.B). En las bandas de 28 y 30 kDa se alcanzaron niveles comparables a los de la rata control, análogamente, por otra parte, a lo ya descrito en el experimento de rehabilitación de ratas diabéticas adultas (Fig. 3.31.B); estos cambios podrían deberse a los niveles elevados de insulina que caracterizan estas dos situaciones (Fig. 3.28. y Tabla 3.21.).

Estos resultados parecen otorgar a la falta de nutrientes un papel clave en la regulación de los niveles de IGF-I y sus proteínas ligadoras en los animales subnutridos. La insulina tendría un papel permisivo en el aumento de los niveles de ambos, ya que sólo después de

la realimentación es eficaz el tratamiento con insulina para provocar una recuperación en los niveles de IGF-I e IGFBPs en los animales subnutridos y además diabéticos.

#### **4.5.6. Correlaciones establecidas en los experimentos de rehabilitación anteriormente reseñados.**

El estudio de regresión lineal y correlación efectuado en los experimentos de realimentación y tratamiento con insulina, tanto en periodo neonatal como adulto, muestra una correlación negativa entre la IGFBP de 30 kDa y el peso corporal y la insulinemia en periodo neonatal que es positiva en periodo adulto. Como ya se ha comentado, todo apunta a que la naturaleza de las IGFBPs que observamos en torno a 30 kDa es distinta en neonatos y adultos. Un dato a destacar es que la glucemia en los neonatos del experimento de rehabilitación con insulina (Tabla 3.19.) muestra una correlación positiva muy alta con dicha IGFBP que no se observa en el modelo de realimentación (Tabla 3.13.). Luego si comparamos con los animales subnutridos, la glucemia parece estar ejerciendo un papel clave en el aumento de la IGFBP de 30 kDa en los animales diabéticos, propiciando el aumento de esta IGFBP. Todo ello resalta el papel importante de la glucemia en las adaptaciones de los animales diabéticos, y apunta a una correlación positiva entre la hiperglucemia y el posible inhibidor de IGF-I sugerido por otros autores en animales diabéticos (254, 348). En efecto, se ha observado una correlación negativa muy buena entre el peso corporal y los niveles de glucemia en estos animales, tanto neonatos (Tabla 3.19.) como adultos (Tabla 3.20.).

En las correlaciones que se establecen en el experimento de realimentación y tratamiento con insulina de ratas subnutridas y además diabéticas (Tabla 3.24) se encuentra un paralelismo con respecto al experimento de realimentación en adultos (Tabla 3.14.). El efecto de la diabetes producida en estos animales se deja ver en algunos parámetros como la distinta correlación entre glucemia, insulinemia e IGFBP de 30 kD o en la no significación en la correlación entre peso de cuerpo e insulinemia.

Como resumen de todo lo anterior, el estudio de las correlaciones entre diversos parámetros muestra, por una parte, que las regulaciones con respecto a IGFs, peso de cuerpo e IGFBPs (especialmente la de 30 kDa) son distintas en periodo neonatal y adulto en ambas situaciones, diabetes y subnutrición; por otra parte, que los mecanismos reguladores en la diabetes difieren sustancialmente de los que intervienen en la subnutrición, y que en dicha diferencia parece desempeñar la hiperglucemia un papel clave.

Estos experimentos de rehabilitación in vivo parecen conferir una gran importancia a los nutrientes como moduladores de los niveles de IGF-I circulante y creemos que son la primera tentativa experimental tratando de establecer la importancia del papel de la insulina

y los nutrientes en los dos modelos que venimos comentando. Estos experimentos deberán ser ampliados en el futuro con cuidadosa determinación de los niveles de GH circulante, que ya estamos efectuando.

## **5. CONCLUSIONES**

## 5. CONCLUSIONES

1. Se establece la metodología más idónea a seguir en rata neonatal para separar las proteínas ligadoras de IGF (IGFBPs) en suero. Para ello se determina, mediante RIA, la concentración de IGF-I en suero previo tratamiento con filtración en gel (método de referencia establecido en la literatura), extracción en ácido-etanol con crioprecipitación y extracción en ácido fórmico-acetona. Se concluye que la extracción en ácido fórmico acetona proporciona valores de IGF-I superiores a los obtenidos con filtración en gel en ratas controles neonatales y en ratas subnutridas neonatales y adultas, mientras que la extracción en ácido-etanol con crioprecipitación proporciona valores superiores a la filtración en gel en ratas subnutridas neonatales.
2. El análisis de las proteínas ligadoras de IGF mediante "Western ligand blot", muestra que la separación de éstas es completa con la filtración en gel, pero no con extracción en ácido-etanol con crioprecipitación y ácido fórmico-acetona: las proteínas ligadoras de 40-50 kDa son las más eficazmente separadas por ambos métodos, mientras que las de menor peso molecular (30 kDa y 24 kDa) permanecen en mayor proporción en los extractos, especialmente con extracción en ácido fórmico-acetona. Esto establece la no validez de las extracciones en ácido-etanol con crioprecipitación y ácido fórmico-acetona para su aplicación al suero de rata en periodo neonatal, en el cual estas formas de bajo peso molecular son las más abundantes.
3. En la rata la gestación provoca un descenso generalizado de la cantidad de proteína ligadora de IGF en suero (siendo las formas de 40-50 kDa prácticamente indetectables), junto con un descenso de los niveles de IGF-I circulante, en comparación con la rata virgen. Estos cambios no se ven modificados ni por la subnutrición (desde el día 16 de gestación) ni por la diabetes (provocada por inyección de estreptozotocina el día 16 de gestación) entre los días 18 y 21 de gestación. Ambas situaciones provocan, sin embargo, un descenso en la ganancia de peso a lo largo del periodo de gestación estudiado. La glucemia y la insulinemia sólo se vieron alteradas en las ratas diabéticas, con elevación de la primera y descenso de la segunda, con respecto a la rata gestante control.

4. El peso fetal no se altera, con respecto a los controles, en los modelos de subnutrición y diabetes estudiados en este trabajo; no obstante, el peso de los recién nacidos subnutridos es inferior al de los controles. La subnutrición provoca un descenso en los niveles de IGF-II en suero a 18 y 19 días, sin alterar ni la glucemia ni la insulinemia; por el contrario, en la diabetes se observa un incremento de los niveles de IGF-II a 18, 19 y 21 días, junto con un descenso de la insulinemia a 19 y 21 días y un marcado incremento de la glucemia en todos los estadios. La proteína ligadora de IGF más abundante en periodo fetal, identificada como IGFBP-2 mediante "Western immunoblot", no experimenta cambios en ninguno de los dos modelos.
5. En periodo neonatal el peso corporal es inferior al de los animales control tanto en los subnutridos (a 8, 14 y 22 días) como en los diabéticos (a 14 y 22 días); la diferencia con los controles es más marcada en el modelo de subnutrición que en el de diabetes. En ambos modelos los niveles de IGF-I e insulina son bajos, en relación con los controles, siendo hipoglucémicos los animales subnutridos y marcadamente hiperglucémicos los diabéticos. IGF-II se encuentra alterado sólo en los neonatos diabéticos a 8 y 14 días, con niveles inferiores a los controles.
6. La proteína ligadora de IGF de 30 kDa, forma más abundante en periodo neonatal, disminuye de intensidad progresivamente con la edad, patrón contrario al que se observa en la de 40-50 kDa. Tanto en la subnutrición como en la diabetes la intensidad de esta banda de 30 kDa está elevada con respecto a las ratas controles, debiéndose este incremento a formas de proteína ligadora de IGF distintas en ambos modelos, como revela el análisis mediante "Western immunoblot".
7. La subnutrición provoca un descenso del ligamiento específico de IGF-II a hígado neonatal a 8, 14 y 22 días, mientras que en la diabetes se observa un aumento a 8 y 14 días. La constante de afinidad de este ligamiento no se ve alterada en ninguno de los dos modelos. No se observan cambios en el ligamiento de IGF-I o II a cerebro en periodo neonatal, y no se detecta ligamiento de IGF-I a hígado por encima de 8 días.
8. La realimentación durante 6 días de ratas neonatales subnutridas, provoca una recuperación del peso, la glucemia y las distintas formas de proteínas ligadoras de IGF, en relación con ratas controles; sin embargo, IGF-I se recupera parcialmente. El tratamiento de ratas neonatales diabéticas con insulina durante 5 días normaliza



la glucemia y provoca la recuperación del peso y los niveles de IGF-I hasta alcanzar los valores de las ratas control, pero las proteínas ligadoras de IGF de 40-50 kDa y 27-30 kDa sólo se recuperan parcialmente. En ambos modelos la insulinemia al final del experimento se encuentra elevada por encima de los niveles de la rata control.

9. La realimentación durante 6 días de ratas adultas subnutridas se acompaña de una recuperación de la glucemia y la insulinemia. El peso, los niveles de IGF-I y las distintas formas de proteínas ligadoras de IGF sólo se recuperan parcialmente. El tratamiento de ratas adultas diabéticas con insulina durante 5 días normaliza la glucemia y produce la recuperación del peso y los niveles de IGF-I y las distintas formas de proteínas ligadoras de IGF hasta alcanzar valores similares a los de la rata control; la insulinemia se encuentra por encima de los niveles que presenta la rata adulta control.
10. El tratamiento con insulina durante 5 días de ratas adultas subnutridas a las que se provocó además un cuadro de diabetes con estreptozotocina restablece los niveles de insulinemia de la rata control, pero no produce efecto sobre el peso corporal, los niveles de IGF-I y las distintas formas de proteínas ligadoras de IGF analizadas por "Western ligand blot". Por el contrario, el tratamiento con insulina acompañado de realimentación en los mismos animales provoca un aumento de peso y una recuperación parcial de los niveles de IGF-I y las distintas formas de proteínas ligadoras, siendo los niveles de insulina superiores a los de las ratas control.

En resumen, de los resultados de este trabajo se establece, en primer lugar la necesidad de efectuar la eliminación de las proteínas ligadoras únicamente por filtración en gel para obtener resultados válidos en la determinación de los niveles de IGF en suero en estos periodos de desarrollo.

El estudio comparativo de las alteraciones de los niveles en suero de IGF-I y II, así como de sus proteínas ligadoras, junto con los cambios en la glucemia y la insulinemia, en los modelos de subnutrición y diabetes en rata durante el periodo fetal y lactante, muestra que las adaptaciones a ambas situaciones presentan modalidades distintas en las diferentes etapas del desarrollo. En periodo fetal las variaciones de IGF-II, factor de crecimiento fetal, parecen estar moduladas por la glucemia, factor nutricional primordial en esta etapa, y las proteínas ligadoras no se alteran. En periodo neonatal las proteínas ligadoras

de IGF correspondientes a la banda de 30 kDa se elevan tanto en la subnutrición como en la diabetes, a la par que disminuyen los niveles de IGF-I con respecto a las ratas controles, pero las correlaciones que se establecen parecen mostrar una distinta modalidad de adaptación en ambas situaciones, subnutrición y diabetes, con la posible existencia, ya sugerida en la literatura, de un inhibidor de IGF-I en la diabetes, que además presenta una correlación positiva con la glucemia.

Los estudios de rehabilitación en ambas situaciones en periodo neonatal parecen sugerir una mayor modulación de las proteínas ligadoras de IGF por nutrientes y una más pronta recuperación de los niveles de IGF-I en ratas diabéticas tratadas con insulina que están debidamente alimentadas.

Los estudios de rehabilitación realizados en rata adulta subnutrida o diabética ratifican, en estos animales, una disminución de las proteínas ligadoras de IGF del complejo de 40-50 kDa, y, en general, de toda las proteínas ligadoras. Parece sugerirse, también en adulto, una mayor dependencia del estado nutricional de los niveles de IGF-I y las proteínas ligadoras. El último experimento, realizado en animales adultos subnutridos, muestra la importancia del estado nutricional, tanto en la modulación de los niveles de IGF-I como de sus proteínas ligadoras. Podría decirse que en el animal adulto subnutrido la insulina sería un agente permisivo para regularizar las alteraciones encontradas, pero la realimentación parece el agente decisivo en la recuperación de todos los parámetros estudiados.

## **5. BIBLIOGRAFIA**

## 5. BIBLIOGRAFIA

1. **Froesch ER, Schmid C, Schwander J, Zapf.** 1985. Actions of insulin-like growth factors. *Ann Rev Physiol* 47:443.
2. **Salmon WD, Daughaday WH.** 1957. A hormonally controlled serum factor which stimulates sulfate incorporation by cartilage *in vitro*. *J Lab Clin Med* 49:825.
3. **Froesch ER, Bürgi H, Ramseier EB, Bally P, Labhart A.** 1963. Antibody-suppressible and nonsuppressible insulin-like activities in human serum and their physiological significance. *J Clin Invest* 42:1816.
4. **Pierson RW, Temin HM.** 1972. The partial purification from calf serum of a fraction with multiplication-stimulating activity for chicken fibroblasts in the cell culture and with non-suppressible insulin-like activity. *J Cell Physiol* 79:319.
5. **Rinderknecht E, Humbel RE.** 1978. The aminoacid sequence of human insulin-like growth factor I and its structural homology with proinsulin. *J Biol Chem* 253:2769.
6. **Rinderknecht E, Humbel RE.** 1978. Primary structure of human insulin-like growth factor II. *FEBS Lett* 89:283.
7. **Daughaday WH, Hall K, Salmon WD, Van den Brande JL, Van Wyk JJ.** 1987. On the nomenclature of the somatomedins and insulin-like growth factors (letter). *Endocrinology* 121:1911.
8. **Froesch ER, Zapf J.** 1985. Insulin-like growth factors and insulin: comparative aspects. *Diabetologia* 28:485.
9. **Rechler MM, Nissley SP.** 1990. Insulin-like growth factors. En "Peptide Growth Factors and Their Receptors", p. 263. Sporn MB, Roberts AB (eds.) Handbook of Experimental Pharmacology vol. 95/I. Springer Verlag, Berlín.
10. **Rubin JS, Mariz I, Jacobs JW, Daughaday WH, Bradshaw RA.** 1982. Isolation and partial sequence analysis of rat basic somatomedin. *Endocrinology* 110:734.
11. **Shimatsu A, Rotwein P.** 1987. Mosaic evolution of the insulin-like growth factors. Organization, sequence and expression of the rat insulin-like growth factor I gene. *J Biol Chem* 262:7894.
12. **Marquardt H, Todaro GJ, Henderson LE, Oroszlan S.** 1981. Purification and primary structure of a polypeptide with multiplication-stimulating activity from rat liver cell cultures. Homology with human insulin-like growth factor II. *J Biol Chem* 256:6859.

13. **Dull TJ, Gray A, Hayflick JS, Ullrich A.** 1984. Insulin-like growth factor II precursor gene organization in relation to insulin gene family. *Nature* 310:777.
14. **Daughaday W, Rotwein P.** 1989. Insulin-like growth factors I and II. Peptide, messenger ribonucleic acid and gene structures, serum and tissue concentrations. *Endocrine Reviews* 10:68.
15. **Daughaday W, Emanuele MA, Brooks MH, Barbato AL, Kapadia M, Rotwein P.** 1988. Synthesis and secretion of insulin-like growth factor II by a leiomyosarcoma with associated hypoglycemia. *N Eng J Med* 319:1434.
16. **Powell DR, Lee PDK, Chang D, Liu F, Hintz R.** 1987. Antiserum developed for the E peptide region of insulin-like growth factor IA prohormone recognizes a serum protein by both immunoblot and radioimmunoassay. *J Clin Endocrinol Metab* 65:868.
17. **Sara VR, Hall K.** 1990. Insulin-like growth factors and their binding proteins. *Physiol Rev* 70:591.
18. **Sussenbach JS, Steenbergh PH, Holthuizen P.** 1992. Structure and expression of the human insulin-like growth factor genes. *Gr Regul* 2:1.
19. **Clemmons DR, Shaw DS.** 1986. Purification and biologic properties of fibroblast somatomedin. *J Biol Chem* 261:10293.
20. **Moses AC, Nissley SP, Short PA, Rechler MM, Podskalny JM.** 1980. Purification and characterization of multiplication-stimulating activity. Insulin-like growth factors purified from rat-liver-cell-conditioned medium. *Eur J Biochem* 103:387.
21. **Schwander JC, Hauri C, Zapf J, Froesch ER.** 1983. Synthesis and secretion of insulin-like growth factor and its binding protein by the perfused rat liver: dependence on growth hormone status. *Endocrinology* 113:297.
22. **Mathews LS, Norstedt G, Palmiter RD.** 1986. Regulation of insulin-like growth factor I gene expression by growth hormone. *Proc Natl Acad Sci USA* 83:9343.
23. **Wang HS, Chard T.** 1992. The role of insulin-like growth factor-I and insulin-like growth factor-binding protein-1 in the control of human fetal growth. *J Endocrinol* 132:11.
24. **Gluckman PD, Liggins GC.** 1984. Regulation of fetal growth. In "Fetal Physiology and Medicine: the Basis of Perinatology", p. 511. Beard RW, Nathanielsz PW (eds.). WB Saunders, Londres.

25. **Swenne I, Hill DJ, Strain AJ, Milner RDG.** 1987. Effects of human placental lactogen and growth hormone on the production of insulin and somatomedin C/insulin-like growth factor I by human fetal pancreas in tissue culture. *J Endocrinol* 113:297.
26. **Simon P, Decoster C, Brocas H, Schwers J, Vassart G.** 1986. Absence of human chorionic somatomammotropin during pregnancy associated with two types of gene deletion. *Human Genetics* 74:235.
27. **Hill DJ, Milner RDG.** 1985. Insulin as a growth factor. *Pediatr Res* 19:879.
28. **Kogawa N, Takano A, Asakawa K, Hizuka N, Tsushima T, Shizume K.** 1983. Insulin stimulation of somatomedin production in monolayer cultures of rat hepatocytes. *Acta Endocrinol (Copenh)* 103:38.
29. **Binoux M, Lassarre C, Hardouin N.** 1982. Somatomedin production by rat liver in organ culture. III. Studies on the release of insulin-like growth factor and its binding protein measured by radioligand assays. Effects of growth hormone, insulin and cortisol. *Acta Endocrinol (Copenh)* 99:42.
30. **Daughady WH, Phillips LC, Mueller MC.** 1976. The effects of insulin and growth hormone on the release of somatomedin by the isolated rat liver. *Endocrinology* 98:1214.
31. **Bryson JM, Tuch BE, Baxter RC.** 1989. Production of insulin-like growth factor-II by human fetal pancreas in culture. *J Endocrinol* 121:367.
32. **Lanes R, Recker B, Fort P, Lifshitz F.** 1985. Impaired somatomedin generation test in children with insulin dependent diabetes mellitus. *Diabetes* 34:156.
33. **Fagin JA, Roberts CT, LeRoith D, Brown AT.** 1989. Co-ordinate decrease of tissue insulin-like growth factor I posttranscriptional alternative mRNA transcripts in diabetes mellitus. *Diabetes* 38:428.
34. **Rodríguez-Arnan J, Miell JP, Ross RJM.** 1993. Influence of thyroid hormones on the GH-IGF-I axis. *Trends Endocrinol Metab* 4:169.
35. **Ikeda T, Fujiyama K, Hoshino T, Tanaka Y, Takeuchi T, Mashiba H, Tominaga M.** 1991. Stimulating effect of thyroid hormone on insulin-like growth factor I release and synthesis by perfused rat liver. *Growth Regul* 1:39.
36. **Beck F, Samani NJ, Senior P, Byrne S, Morgan K, Gebhard R, Brammar WJ.** 1988. Control of IGF-II mRNA levels by glucocorticoids in the neonatal rat. *J Mol Endocrinol* 1:R5.

37. **Maes M, Underwood LE, Ketelslegers JM.** 1983. Plasma somatomedin-C in fasted and refed rats: close relationship with changes in liver somatogenic (GH) but not lactogenic (PRL) binding sites. *J Endocrinol* 97:243.
38. **Maes M, Underwood LE, Ketelslegers JM.** 1984. Low somatomedin-C in protein deficiency: relationship with changes in liver somatogenic and lactogenic binding sites. *Mol Cell Endocrinol* 37:301.
39. **Goldstein S, Sertich GJ, Levan KR, Phillips LS.** 1988. Nutrition and somatomedin. 19. Molecular regulation of insulin-like growth factor I in streptozotocin-diabetic rats. *Mol Endocrinol* 2:1093.
40. **Rotwein P, Burgess SK, Milbrandt JD, Krause JE.** 1988. Differential expression of insulin-like growth factor genes in rat central nervous system. *Proc Natl Acad Sci USA* 85:265-269.
41. **Bortz JD, Rotwein P, DeVol D, Bechtel PJ, Hansen VA, Hammerman MR.** 1988. Focal expression of insulin-like growth factor I in rat kidney collecting duct. *J Cell Biol* 107:811.
42. **Stylianopoulou F, Efstratiadis A, Herbert J, Pintar J.** 1988. Pattern of the insulin-like growth factor II gene expression during rat embryogenesis. *Development* 103:497.
43. **Scott J, Cowell J, Robertson ME, Priestly LM, Wadey R, Hopkins B, Pritchard J, Bell GI, Rall LB, Graham CF, et al.** 1985. Insulin-like growth factor-II gene expression in Wilm's tumour and embryonic tissues. *Nature* 317:260.
44. **Daughaday WH.** 1990. The possible autocrine/paracrine and endocrine roles of insulin-like growth factors of human tumors (editorial). *Endocrinology* 127:1.
45. **Humbel RE.** 1990. Insulin-like growth factors I and II. *Eur J Biochem* 190:445.
46. **Stiles CD, Capone GI, Sher CD, Antoniades HN, Van Wyk JJ, Pledger WJ.** 1979. Dual control of cell growth by somatomedin and platelet derived growth factor. *Proc Natl Acad Sci USA* 76:1279.
47. **Zapf J, Froesch ER.** 1986. Insulin-like growth factors/somatomedins: structure, secretion, biological actions and physiological role. *Hormone Res* 24:121.
48. **Zapf J, Hauri C, Waldvogel M, Froesch ER.** 1986. Acute metabolic effects and half-lives of intravenously administered insulinlike growth factors I and II in normal and hypophysectomized rats. *J Clin Invest* 77:1768.

49. **Guler HP, Zapf J, Froesch ER.** 1987. Short-term metabolic effects of recombinant human insulin-like growth factor I in healthy adults. *N Engl J Med* 317:137.
50. **Glasscock GF, Hein AN, Miller JA, Hintz RL, Rosenfeld RG.** 1992. Effects of continuous infusion of insulin-like growth factor I and II, alone and in combination with thyroxine or growth hormone, on the neonatal hypophysectomized rat. *Endocrinology* 130:203.
51. **Zapf J, Hauri C, Waldvogel M, Futo E, Hasler H, Binz K, Guler HP, Schmid C, Froesch ER.** 1989. Recombinant human insulin-like growth factor I induces its own specific carrier protein in hypophysectomized and diabetic rats. *Proc Natl Acad Sci USA* 86:3813.
52. **Chochinov RH, Mariz IK, Daughaday WH.** 1977. Isolation of a somatomedin from plasma of rats bearing growth hormone secreting tumors. *Endocrinology* 100:549.
53. **DeChiara TM, Efstratiadis A, Robertson EJ.** 1990. A growth deficiency phenotype in heterozygous mice carrying an IGF-II gene disrupted by targeting. *Nature* 345:78.
54. **Han VKM, Lund PK, Lee DC, D'Ercole AJ.** 1988. Expression of somatomedin/insulin-like growth factor messenger ribonucleic acids in the human fetus: identification, characterization, and tissue distribution. *J Clin Endocrinol Metab* 66:422.
55. **LeRoith D, Roberts CT.** 1991. Insulin-like growth factor I (IGF-I): a molecular basis for endocrine *versus* local action? *Mol Cell Endocrinol* 77:C57
56. **Giudice LC.** 1992. Insulin-like growth factors and ovarian follicular development. *Endocrine Reviews* 13:641.
57. **Zapf J, Waldvogel M, Froesch ER.** 1975. Binding of non-suppressible insulin-like activity to human serum: evidence for a carrier protein. *Arch Biochem Biophys* 1968:638.
58. **Rechler MM, Brown AL.** 1992. Insulin-like growth factor binding proteins: gene structure and expression. *Growth Regul* 2:55.
59. **Ballard FJ, Baxter RC, Binoux M, Clemmons DR, Drop SLS, Hall K, Hintz RL, Rechler MM, Rutanen EM, Schwander JC.** 1989. On the nomenclature of the IGF binding proteins (letter to the editor). *Acta Endocrinol (Copenh)* 121:751.



60. **Ballard FJ, Baxter RC, Binoux M, Clemmons DR, Drop SLS, Hall K, Hintz RL, Ling N, Mohan S, Rechler MM, Rutanen EM, Schwander JC, Spencer EM, Zapf J.** 1992. Report on the nomenclature of the IGF binding proteins. *Endocrinology* 130:1736.
61. **Rechler MM.** 1993. Insulin-like growth factor binding proteins. *Vitam Horm* 47:1.
62. **Drop SLS, Schuller AGP, Lindenberg-Kortleve DJ, Groffen C, Brinkman A, Zwarthoff EC.** 1992. Structural aspects of the IGFBP family. *Growth Regul* 2:69.
63. **Jones JI, D'Ercole AJ, Camacho-Hubner C, Clemmons DR.** 1991. Phosphorylation of insulin-like growth factor binding protein 1 in cell culture and in vivo: effects on affinity for IGF-I. *Proc Natl Acad Sci USA* 88:7481.
64. **Leong SM, Baxter RC, Camerato T, Dai J, Wood WI.** 1992. Structure and functional expression of the acid-labile subunit of the insulin-like growth factor binding protein complex. *Mol Endocrinol* 6:870.
65. **Baxter RC, Martin JL.** 1989. Structure of the Mr 140,000 growth hormone dependent insulin-like growth factor binding protein complex: determination by reconstitution and affinity-labelling. *Proc Natl Acad Sci USA* 86:6898.
66. **Baxter RC.** 1990. Circulating levels and molecular distribution of the acid-labile ( $\alpha$ ) subunit of the high molecular weight insulin-like growth factor-binding protein complex. *J Clin Endocrinol Metab* 70:1347.
67. **Scott CD, Baxter RC.** 1991. Synthesis of the acid-labile subunit of the insulin-like growth factor-binding protein complex by rat hepatocytes in culture. *Biochem J* 275:441.
68. **Baxter RC.** 1993. Circulating binding proteins for the insulinlike growth factors. *Trends Endocrinol Metab* 4:91.
69. **Clemmons DR.** 1990. Insulinlike growth factor binding proteins. *Trends Endocrinol Metab* 1:412.
70. **Zapf J, Schmid C, Guler HP, Waldvogel M, Hauri C, Futo E, Hossenlopp P, Binoux M, Froesch ER.** 1990. Regulation of binding proteins for insulin-like growth factor (IGF) in humans. *J Clin Invest* 86:952.
71. **Nissley SP, Rechler MM.** 1984. Insulin-like growth factors: biosynthesis, receptors, and carrier proteins. En "Hormonal Proteins and Peptides" Vol 12, p. 127. Li CH (ed.). Academic Press, Nueva York.

72. **Murphy LJ, Seneviratne C, Ballejo G, Croze F, Kennedy TG.** 1990. Identification and characterization of a rat decidual insulin-like growth factor-binding protein complementary DNA. *Mol Endocrinol* 4:329.
73. **Julkunen M, Koistinen R, Suikkari AM, Seppälä M, Jänne OA.** 1990. Identification by hybridization histochemistry of human endometrial cells expressing mRNAs encoding a uterine beta-lactoglobulin homologue and insulin-like growth factor-binding protein-1. *Mol Endocrinol* 4:700.
74. **Tseng LYH, Brown AL, Yang YWH, Romanus JA, Orlowsky CC, Taylor T, Rechler MM.** 1989. The fetal rat binding protein for insulin-like growth factors is expressed in the choroid plexus and cerebrospinal fluid of adult rats. *Mol Endocrinol* 3:1559.
75. **Albiston AL, Herington AC.** 1992. Tissue distribution and regulation of insulin-like growth factor (IGF)-binding protein-3 messenger ribonucleic acid (mRNA) in the rat: comparison with IGF-I mRNA expression. *Endocrinology* 130:497.
76. **Lamson G, Oh Y, Pham H, Giudice LC, Rosenfeld RG.** 1989. Expression of two insulin-like growth factor-binding proteins in a human endometrial cancer cell line: structural, immunological, and genetic characterization. *J Clin Endocrinol Metab* 69:852.
77. **Takenaka A, Miura Y, Mori M, Hirose M, Kato H, Noguchi T.** 1991. Distribution of messenger RNAs of insulin-like growth factor (IGF)-binding proteins-1 and -3 between parenchymal and nonparenchymal cells in rat liver. *Agric Biol Chem* 55:1191.
78. **Shimasaki S, Gao L, Shimonaka M, Ling N.** 1991. Isolation and molecular cloning of insulin-like growth factor-binding protein-6. *Mol Endocrinol* 5:938.
79. **Smith EP, Dickson BA, Chernausk SD.** 1990. Insulin-like growth factor binding protein-3 secretion from cultured rat Sertoli cells: dual regulation by follicle stimulating hormone and insulin-like growth factor-I. *Endocrinology* 127:2744.
80. **Póvoa G, Engber G, Jornvall H, Hall K.** 1984. Isolation and characterization of a somatomedin-binding protein from mid-term human amniotic fluid. *Eur J Biochem* 144:199.
81. **Hall K, Brismar K, Degerblad M, Ehrenborg E, Gutniak M, Luthman H, Póvoa G.** 1989. Serum levels of 25k binding protein and their regulation. En "Insulin-like Growth Factor Binding Proteins", pp. 21. Drop SLS, Hintz RL (eds.). Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam.

82. **Rutanen EM, Bohn H, Seppälä M.** 1982. Radioimmunoassay of placental protein 12: levels in amniotic fluid, cord blood, and serum of healthy adults, pregnant women, and patients with trophoblastic disease. *Am J Obstet Gynecol* 144:460.
83. **Baxter RC, Cowell CT.** 1987. Diurnal rhythm of growth hormone-independent binding protein for insulin-like growth factors in human plasma. *J Clin Endocrinol Metab* 65:432.
84. **Hall K, Lundin G, Póvoa G.** 1988. Serum levels of the low molecular weight form of insulin-like growth factor binding protein in healthy subjects and patients with growth hormone deficiency, acromegaly and anorexia nervosa. *Acta Endocrinol (Copenh)* 118:321.
85. **Snyder DK, Clemmons DR.** 1990. Insulin-dependent regulation of insulin-like growth factor-binding protein-1. *J Clin Endocrinol Metab* 71:1632.
86. **Cotterill AM, Cowell CT, Baxter RC, McNeil D, Silink M.** 1988. Regulation of the growth hormone-independent growth factor-binding protein in children. *J Clin Endocrinol Metab* 67:882.
87. **Suikkari AM, Koivisto VA, Rutanen EM, Yki-Järvinen H, Karonen SL, Seppälä M.** 1988. Insulin regulates the serum levels of low molecular weight insulin-like growth factor-binding protein. *J Clin Endocrinol Metab* 66:266.
88. **Lewit MS, Baxter RC.** 1991. Insulin-like growth factor-binding protein: a role in glucose counterregulation?. *Mol Cell Endocrinol* 79:C147.
89. **Seneviratne C, Jiangming L, Murphy LJ.** 1990. Transcriptional regulation of rat insulin-like growth factor-binding protein-1 expression by growth hormone. *Mol Endocrinol* 4:1199.
90. **Murphy LJ, Seneviratne C, Moreira P, Reid RE.** 1991. Enhanced expression of insulin-like growth factor-binding protein-I in the fasted rat: the effects of insulin and growth hormone administration. *Endocrinology* 128:689.
91. **Unterman TG, Patel K, Mahathre VK, Rajamohan C, Oehler DT, Becker RE.** 1990. Regulation of low-molecular weight insulin-like growth factor-binding proteins in experimental diabetes mellitus. *Endocrinology* 126:2614.
92. **Ooi GT, Orlowsky CC, Brown AL, Becker RE, Unterman TG, Rechler MM.** 1990. Different tissue distribution and hormonal regulation of mRNAs encoding rat insulin-like growth factor binding proteins-1 and -2. *Mol Endocrinol* 4:321.
93. **Orlowski CC, Ooi GT, Brown DR, Yang YWH, Tseng LYH, Rechler MM.** 1991. Insulin rapidly inhibits insulin-like growth factor binding protein-1 gene expression in H4-II-E rat hepatoma cells. *Mol Endocrinol* 5:1180.

94. **Unterman TG, Oehler DT, Murphy LJ, Lascon RG.** 1991. Multihormonal regulation of insulin-like growth factor-binding protein-1 in rat H4IIE hepatoma cells: the dominant role of insulin. *Endocrinology* 128:2693.
95. **Bar RS, Boes M, Clemmons DR, Busby WH, Sandra A et al.** 1990. Insulin differentially alters transcapillary movement of intravascular IGFBP-1, IGFBP-2 and endothelial cell IGF-binding proteins in the rat heart. *Endocrinology* 127:497-499.
96. **Luo J, Reid RE, Murphy LJ.** 1990. Dexamethasone increases hepatic insulin-like growth factor binding protein-1 (IGFBP-1) mRNA and serum IGFBP-1 concentrations in the rat. *Endocrinology* 127:1456.
97. **Hardouin S, Gourmelen M, Noguiez P, Seurin D, Roghani M, Le Bouc Y, Póvoa G, Merimee TJ, Hossenlopp P, Binoux M.** 1989. Molecular forms of serum insulin-like growth factor (IGF)-binding proteins in man: relationships with growth hormone and IGFs and physiological significance. *J Clin Endocrinol Metab* 69:1291.
98. **Schwander J, Mary JL.** 1991. A radioimmunoassay for hIGFBP-2; first suggestion of insulin dependence of serum levels. *Program 73rd Annu Meet Endocr Soc* 480 (Abstract 1799).
99. **Böni-Schnetzler M, Binz K, Mary JL, Schmid C, Schwander J, Froesch ER.** 1989. Regulation of hepatic expression of IGF-I and fetal IGF binding protein mRNA in streptozotocin diabetic rats. *FEBS Lett* 251:263.
100. **Camacho-Hubner C, Clemmons DR, D'Ercole AJ.** 1991. Regulation of insulin-like growth factor (IGF) binding proteins in transgenic mice with altered expression of growth hormone and IGF-I. *Endocrinology* 129:1201.
101. **Orlowski CC, Brown AL, Ooi GT, Yang YWH, Tseng LYH, Rechler MM.** 1990. Tissue, developmental and metabolic regulation of messenger RNA encoding a rat insulin-like growth factor-binding protein (IGFBP-2). *Endocrinology* 126:644.
102. **Straus DS, Takemoto CD.** 1990. Effect of dietary protein deprivation on insulin-like growth factor (IGF) I and II, IGF binding protein-2 and serum albumin gene expression in rat. *Endocrinology* 127:1849.
103. **Straus DS, Takemoto CD.** 1991. Specific decrease in liver insulin-like growth factor-I and brain insulin-like growth factor-II gene expression in energy-restricted rats. *J Nutr* 121:1279.
104. **Baxter RC, Martin JL.** 1986. Radioimmunoassay of growth hormone-dependent insulin-like growth factor binding protein in human plasma. *J Clin Invest* 78:1504.

105. **Donovan SM, Oh Y, Pham H, Rosenfeld RG.** 1989. Ontogeny of serum insulin-like growth factor binding proteins in the rat. *Endocrinology* 125:2621.
106. **Blum WF, Ranke MB, Kietzman K, Gauggel E, Zeisel HJ, Bierich JR.** 1990. A specific radioimmunoassay for the growth hormone (GH)-dependent somatomedin-binding protein: its use for diagnosis of GH deficiency. *J Clin Endocrinol Metab* 70:1292.
107. **Clemmons DR, Thissen JP, Maes M, Ketelslegers JM, Underwood LE.** 1989. Insulin-like growth factor-I (IGF-I) infusion into hypophysectomized or protein-deprived rats induces specific IGF binding proteins in serum. *Endocrinology* 125:2967.
108. **Giudice LC, Farrell EM, Pham H, Lamson G, Rosenfeld R.** 1990. Insulin-like growth factor binding proteins in maternal serum throughout gestation and in the puerperium: effects of a pregnancy associated serum protease activity. *J Clin Endocrinol Metab* 71:806.
109. **Hossenlopp P, Segovia B, Lassarre C, Roghani M, Bredon M, Binoux M.** 1990. Evidence of enzymatic degradation of insulin-like growth factor-binding proteins in the 150K complex during pregnancy. *J Clin Endocrinol Metab* 71:797.
110. **Binoux M, Hossenlopp P, Lassarre C, Segovia B.** 1991. Degradation of IGF binding protein-3 by proteases: physiological implications. En "Modern Concepts of Insulin-Like Growth Factors", pp. 329. Spencer EM (ed.). Elsevier Science Publishing B.V., Amsterdam.
111. **Shimonaka M, Schroeder R, Shimasaki S, Ling N.** 1989. Identification of a novel binding protein for insulin-like growth factors in adult rat serum. *Biochem Biophys Res Commun* 165:189.
112. **Rosen C, Donahue LR, Hunter S, Holick M, Kavookian H, Kirschenbaum A, Mohan S, Baylink DJ.** 1992. The 24/25-kD serum insulin-like growth factor-binding protein is increased in elderly women with hip and spine fractures. *J Clin Endocrinol Metab* 74:24.
113. **Shimasaki S, Shimonaka M, Zhang HP, Ling N.** 1991. Identification of five different insulin-like growth factor binding proteins (IGFBPs) from adult rat serum and molecular cloning of a novel IGFBP-5 in rat and human. *J Biol Chem* 266:10664.
114. **Baxter RC, Saunders H.** 1992. Radioimmunoassay of insulin-like growth factor-binding protein-6 in human serum and other body fluids. *J Endocrinol* 134:133.
115. **Guler HP, Zapf J, Schmid C, Froesch ER.** 1989. IGF-I and II in healthy man: estimation of half-lives and production rates. *Acta Endocrinol (Copenh)* 121:753.

116. **Ballard FJ, Knowles SE, Walton PE, Edson K, Owens PC, Mohler MA, Feraiole BL.** 1991. Plasma clearance and tissue distribution of labelled IGF-I, -II and des(1-3)IGF in rats. *J Endocrinol* 128:197.
117. **Campbell PG, Novak JF, Janosick TB, McMaster JH.** 1992. Involvement of the plasmin system in dissociation of the insulin-like growth factor-binding protein complex. *Endocrinology* 130:1401.
118. **Clemmons DR, Cascieri MA, Camacho-Hubner C, McCusker RH, Bayne ML.** 1990. Discrete alterations of the insulin-like growth factor I molecule which alter its affinity for insulin-like growth factor-binding proteins result in changes in bioactivity. *J Biol Chem* 265:12210.
119. **McCusker RH, Camacho-Hubner C, Bayne ML, Cascieri MA, Clemmons DR.** 1990. Insulin-like growth factor (IGF) binding to human fibroblast and glioblastoma cells: the modulating effect of cell released IGF binding proteins (IGFBPs). *J Cell Physiol* 144:244.
120. **Biscak TA, Motoyuki S, Malkowski M, Ling N.** 1990. IGFBP inhibition of granulosa cell function: effect on cyclic adenosine 3',5'-monophosphate, deoxyribonucleic acid synthesis, and comparison with the effect of an IGF-I antibody. *Endocrinology* 126:2184.
121. **Booth BA, Bar RS, Boes M, Dake BL, Bayne M, Cascieri M.** 1990. Intrinsic bioactivity of IGF binding proteins from vascular endothelial cells. *Endocrinology* 127:2630.
122. **Hintz RL.** 1990. Role of growth hormone and insulin-like growth factor binding proteins. *Hormone Res* 33:105.
123. **Rechler MM, Nissley SP.** 1985. The nature and regulation of the receptors for insulin-like growth factors. *Ann Rev Physiol* 47:425.
124. **Ullrich A, Gray A, Tam AW, Yang-Feng T, Tsubokawa M, Collins C, Henzel W, Le Bon T, Kathuria S, Chen E, Jakobs S, Francke U, Ramachandran J, Fujita-Yamaguchi I.** 1986. Insulin-like growth factor-I receptor primary structure: comparison with insulin receptor suggests structural determinants that define functional specificity. *EMBO J* 5:2503.
125. **Shemer J, Raizada MK, Masters BA, Ota A, LeRoith D.** 1987. Insulin-like growth factor I receptors in neuronal and glial cells. *J Biol Chem* 262:7693.
126. **Kornfeld S.** 1992. Structure and function of the mannose 6-phosphate/insulin-like growth factor II receptors. *Annu Rev Biochem* 61:307.

127. **Méresse S, Ludwig T, Frank R, Hoflack B.** 1990. Phosphorilation of the cytoplasmic domain of the bovine cation-independent mannose 6-phosphate receptor. *J Biol Chem* 265:18833.
128. **White RM, Nissley SP, Short PA, Rechler MM, Fennoy I.** 1982. Developmental pattern of a serum binding protein for multiplication stimulating activity in the rat. *J Clin Invest* 69:1239.
129. **Kies W, Greenstein LA, White RM, Lee L, Rechler M, Nissley SP.** 1987. Type II insulin-like growth factor receptor is present in rat serum. *Proc Natl Acad Sci USA* 84:7720.
130. **Causin C, Waheed A, Braulke T, Junghans U, Maly P, Humbel RE, von Figura K.** 1988. Mannose 6-phosphate/insulin-like growth factor II binding proteins in human serum and urine. *Biochem J* 252:795.
131. **Czech MP.** 1989. Signal transmission by the insulin-like growth factors. *Cell* 59:235.
132. **Steele-Perkins G, Turner J, Edman JC, Hari J, Pierce SB, Stover C, Rutter WJ, Roth RA.** 1988. Expression and characterization of a functional human insulin-like growth factor I receptor. *J Biol Chem* 263:11486.
133. **Clairmont KB, Czech MP.** 1989. Chicken and *Xenopus* mannose 6-phosphate receptors fail to bind insulin-like growth factor II. *J Biol Chem* 264:16390.
134. **Kahn CR, White MF, Shoelson SE, Backer JM, Araki E, Cheatham B, Csermely P, Folli F, Goldstein BJ, Huertas P, Rothenberg PL, Saad MJA, Siddle K, Sun XJ, Wilden PA, Yamada K, Kahn SA.** 1993. The insulin receptor and its substrate: molecular determinants of early events in insulin action. *Rec Prog Horm Res* 48:291.
135. **Cohick WS, Clemmons DR.** 1993. The insulin-like growth factors. *Annu Rev Physiol* 55:131.
136. **Dahms NM, Lobel P, Kornfeld S.** 1989. Mannose 6-phosphate receptors and lysosomal enzyme targeting. *J Biol Chem* 264:12115.
137. **Nishimoto I, Murayama Y, Katada T, Ui M, Ogata E.** 1989. Possible direct linkage of insulin-like growth factor-II receptor with guanine nucleotide-binding proteins. *J Biol Chem* 264:14029.
138. **Kiess W, Blickenstaff GD, Sklar MM, Thomas CL, Nissley SP, Sahagian GG.** 1988. Biochemical evidence that the type II insulin-like growth factor receptor is identical to the cation-independent mannose 6-phosphate receptor. *J Biol Chem* 263:9339.

139. **Purchio AF, Cooper JA, Brunner AM, Lioubin NM, Gentry LE, Kovacina KS, Roth RA, Marquardt H.** 1988. Identification of mannose 6-phosphate in two asparagine-linked sugar chains of recombinant transforming growth factor- $\beta$ 1 precursor. *J Biol Chem* 263:14211.
140. **Chard T.** 1989. Hormonal control of growth in the human fetus. *J Endocrinol* 123:3.
141. **Milner RDG, Hill DJ.** 1984. Fetal growth control: the role of insulin and related peptides. *Clin Endocrinol* 21:415.
142. **Hill DJ, Milner RDG.** 1985. Insulin as a growth factor. *Pediatric Res.* 19:879.
143. **Milner RDG.** 1981. Growth and development of the endocrine pancreas. En "Scientific Foundation of Pediatrics", p. 701. Davis JA, Dobbing J (eds.). Heinemann, Londres.
144. **De Pablo F, Scott LA, Roth J.** 1990. Insulin and insulin-like growth factor I in early development: peptides, receptors and biological events. *Endocrine Reviews* 11:558.
145. **Watts C, Gain KR.** 1984. Significance of hyperinsulinemia in the rat fetus. En "Lessons from Animal Diabetes", p. 695. Shafrir E, Renold AE (eds.). John Libbey and Comp. Lim., Londres.
146. **Girard J.** 1989. Control of fetal and neonatal glucose metabolism by pancreatic hormones. *Baillière's Clin Endocrinol Metab* 3:817.
147. **Widdowson EM, Crabb DE, Milner RDG.** 1972. Cellular development of some human organs before birth. *Arch Dis Child* 47:652.
148. **LeRoith D, Adamo M, Werner H, Roberts CT.** 1991. Insulin-like growth factors and their receptors as growth regulators in normal physiology and pathologic states. *Trends Endocrinol Metab* 2:134.
149. **Sara VR, Hall K, Lins PE, Fryklund L.** 1980. Serum levels of immunoreactive somatomedin A in the rat; some developmental aspects. *Endocrinology* 107:622.
150. **Moses AC, Nissley SP, Short PA, Rechler MM, White RM, Knight AB, Higa OZ.** 1980. Increased levels of multiplication stimulating activity, an insulin-like growth factor, in fetal rat serum. *Proc Natl Acad Sci USA* 77:3649.
151. **Daughaday WH, Parker KA, Borowsky S, Trivedi B, Kapadia M.** 1982. Measurement of somatomedin-related peptides in fetal, neonatal, and maternal rat serum by insulin-like growth factor (IGF) I radioimmunoassay, IGF-II



radioreceptorassay (RRA), and multiplication stimulating activity RRA after acid-ethanol extraction. *Endocrinology* 110:575.

152. **Bennett A, Wilson DM, Liu F, Nagashima R, Rosenfeld RG, Hintz RL.** 1983. Levels of insulin-like growth factors I and II in human cord blood. *J Clin Endocrinol Metab* 57:609.
153. **Ashton IK, Zapf J, Einshenk I, Mackenzie IZ.** 1985. Insulin-like growth factors (IGF)-1 and (IGF)-2 in human foetal plasma and relationship to gestational age and foetal size during mid-pregnancy. *Acta Endocrinol (Copenh)* 110:558.
154. **Gluckman PD, Johnson-Barrett JJ, Butler JH, Edgar BW, Gunn TR.** 1983. Studies of insulin-like growth factor-I and II by specific radioligand assays in umbilical cord blood. *Clin Endocrinol* 19:405.
155. **Bala LM, Lopatka J, Leung A, McCoy E, McArthur RG.** 1981. Serum immunoreactive somatomedin levels in normal adults, pregnant women at term, children at various ages, and children with constitutionally delayed growth. *J Clin Endocrinol Metab* 52:508.
156. **Corpas E, Harman M, Blackman MR.** 1993. Human growth hormone and human aging. *Endocrine Reviews* 14:20.
157. **Heyner S, Smith RM, Schultz GA.** 1989. Temporally regulated expression of insulin and insulin-like growth factors and their receptors in early mammalian development. *BioEssays* 11:171.
158. **Soares MB, Ishii D, Efstratiadis A.** 1985. Developmental and tissue-specific expression of a family of transcripts related to rat insulin-like growth factor-II mRNA. *Nucleic Acids Res* 13:1119.
159. **Lund PK, Moats-Staats BM, Hynes MA, Simmons JG, Jansen M, D'Ercole AJ, Van Wyk JJ.** 1986. Somatomedin C/insulin-like growth factor-I and insulin-like growth factor-II mRNAs in rat fetal and adult tissues. *J Biol Chem* 261:14539.
160. **Brown AL, Graham DE, Nissley SP, Hill DJ, Strain AJ, Rechler MM.** 1986. Developmental regulation of insulin-like growth factor II mRNA in different rat tissues. *J Biol Chem* 261:13144.
161. **Soares MB, Turken A, Ishii D, Mills L, Episkopou V, Cotter S, Zeitlin S, Efstratiadis A.** 1986. Rat insulin-like growth factor II gene. A single gene with two promoters expressing a multitranscript family. *J Mol Biol* 192:737.
162. **Rotwein P, Pollock KM, Watson M, Milbrant JD.** 1987. Insulin-like growth factor gene expression during rat embryonic development. *Endocrinology* 121:2141.

163. **Romanus JA, Yang YW, Adams SO, Sofair AN, Tseng LY, Nissley SP, Rechler MM.** 1988. Synthesis of insulin-like growth factor II (IGF-II) in fetal rat tissues: translation of IGF-II ribonucleic acid and processing of pre-pro-IGF-II. *Endocrinology* 122:709.
164. **Adamo M, Lowe WL, LeRoith D, Robert CT.** 1989. Insulin-like growth factor I messenger ribonucleic acids with alternative 5'-untranslated regions are differentially expressed during development of the rat. *Endocrinology* 124:2737.
165. **Murphy LJ, Bell GI, Friesen HG.** 1987. Tissue distribution of insulin-like growth factor I and II messenger ribonucleic acid in the adult rat. *Endocrinology* 120:1279.
166. **D'Ercole AJ, Hill DJ, Strain AJ, Underwood LE.** 1986. Tissue and plasma somatomedin-C/insulin-like growth factor I concentrations in the human fetus during the first half of gestation. *Pediatric Res* 20:353.
167. **Hill DJ, Clemmons DR, Wilson S, Han VKM, Strain AJ, Milner RDG.** 1989. Immunological distribution of one form of insulin-like growth factor (IGF)-binding protein and IGF peptides in human fetal tissues. *J Mol Endocrinol* 2:31.
168. **Han VKM, D'Ercole AJ, Lund PK.** 1987. Cellular localization of somatomedin (insulin-like growth factor) messenger RNA in the human fetus. *Science* 236:193.
169. **Romanus JA, Terrell JE, Yang YWH, Nissley SP, Rechler MM.** 1986. Insulin-like growth factor carrier proteins in neonatal and adult rat serum are immunologically different: demonstration using a new radioimmunoassay for the carrier protein from BRL-3A rat liver cells. *Endocrinology* 118:1743.
170. **Lyons RM, Smith GL.** 1986. Characterization of multiplication stimulating activity (MSA) carrier protein. *Mol Cell Endocrinol* 45:263.
171. **Yang YWH, Wang JF, Orlowsky CC, Nissley SP, Rechler MM.** 1989. Structure specificity and regulation of the insulin-like growth factor binding proteins in adult rat serum. *Endocrinology* 125:1540.
172. **D'Ercole AJ, Willson DF, Underwood LE.** 1980. Changes in the circulating form of serum somatomedin-C during fetal life. *J Clin Endocrinol Metab* 51:674.
173. **Lassarre C, Hardouin S, Daffos F, Forestier F, Frankene F, Binoux M.** 1991. Serum insulin-like growth factors and insulin-like growth factor-binding proteins in the human fetus. Relationships with growth in normal subjects and in subjects with intrauterine growth retardation. *Pediatric Res* 29:219.
174. **Babajko S, Hardouin S, Segovia B, Groyer A, Binoux M.** 1993. Expression of insulin-like growth factor binding protein-1 and -2 genes through the perinatal period in the rat. *Endocrinology* 132:2586.

175. **Mohn KL, Melby AE, Tewari DS, Laz TM, Taub R.** 1991. The gene encoding rat insulinlike growth factor-binding protein 1 is rapidly and highly induced in regenerating liver. *Mol Cell Biol* 11:1393.
176. **Brown AL, Chiariotti L, Orlowsky CC, Mehlman T, Burgess WH, Ackerman EJ, Bruni CB, Rechler MM.** 1989 Nucleotide sequence and expression of a cDNA clone encoding a fetal rat binding protein for insulin-like growth factors. *J Biol Chem* 264:5148.
177. **Wood TL, Streck RD, Pintar JE.** 1992. Expression of the IGFBP-2 gene in post-implantation rat embryos. *Development* 114:59.
178. **Brinkman A, Groffen C, Kortleve DJ, van Kessel AG, Drop SLS.** 1988. Isolation and characterization of a cDNA encoding the low molecular weight insulin-like growth factor binding protein (IBP-1). *EMBO J* 7:2417.
179. **Liu F, Powell DR, Styne DM, Hintz RL.** 1991. Insulin-like growth factors (IGFs) and IGF-binding proteins in the developing rhesus monkey. *J Clin Endocrinol Metab* 72:905.
180. **Werner H, Woloschak M, Adamo M, Shen-Orr Z, Roberts CT.** 1989. Developmental regulation of the rat insulin-like growth factor I receptor gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 86:7451.
181. **Alexandrides T, Moses AC, Smith RJ.** 1989. Developmental expression of receptors for insulin, insulin-like growth factor I (IGF-I), and IGF-II in rat skeletal muscle. *Endocrinology* 124:1064.
182. **Bondy CA, Werner H, Roberts CT, LeRoith D.** 1990. Cellular pattern of insulin-like growth factor-I (IGF-I) and type I receptor gene expression in early organogenesis: comparison with IGF-II gene expression. *Mol Endocrinol* 4:1386.
183. **Bondy CA, Werner H, Roberts CT, LeRoith D.** 1992. Cellular pattern of type-I insulin-like growth factor receptor gene expression during maturation of the rat brain: comparison with insulin-like growth factors I and II. *Neuroscience* 46:909.
184. **Mattson BA, Rosenblum IY, Smith AM, Heyner S.** 1986. Autoradiographic evidence for insulin and insulin-like growth factor binding to early mouse embryos. *Diabetes* 37:585.
185. **Heyner S, Rao LV, Jarett L, Smith AM.** 1989. Preimplantation mouse embryos internalize maternal insulin via receptor-mediated endocytosis: pattern of uptake and functional correlations. *Develop Biol* 134:48.

186. **Sara VR, Hall K, Misaki M, Fryklund L, Christensen N, Wetterberg L.** 1983. Ontogenesis of somatomedin and insulin receptors in human fetus. *J Clin Invest* 71:1084.
187. **Sklar MM, Kiess W, Thomas CL, Nissley P.** 1989. Developmental expression of the tissue insulin-like growth factor II/mannose 6-phosphate receptor in the rat. Measurement by quantitative immunoblotting. *J Biol Chem* 264:16733.
188. **Bobek G, Scott CD, Baxter RC.** 1992. Radioimmunoassay of soluble insulin-like growth factor-II/mannose 6-phosphate receptor: developmental regulation of receptor release by rat tissues in culture. *Endocrinology* 130:3387.
189. **Senior PV, Byrne S, Brammar WJ, Beck F.** 1990. Expression of the IGF-II/mannose 6-phosphate receptor mRNA and protein in the developing rat. *Development* 109:67.
190. **Ballesteros M, Scott CD, Baxter RC.** 1990. Developmental regulation of insulin-like growth factor-II/mannose 6-phosphate receptor mRNA in the rat. *Biochem Biophys Res Commun* 172:775.
191. **Sklar MM, Thomas CL, Municchi G, Roberts CT, LeRoith D, Kiess W, Nissley P.** 1992. Developmental expression of rat insulin-like growth factor-II/mannose 6-phosphate receptor messenger ribonucleic acid. *Endocrinology* 130:3484.
192. **Delmis J, Drazancic A, Ivanisevic M, Suchanek E.** 1992. Glucose, insulin, HGH and IGF-I levels in maternal serum, amniotic fluid and umbilical venous serum: a comparison between late normal pregnancy and pregnancies complicated with diabetes and fetal growth retardation. *J Perinat Med* 20:47.
193. **Marshall RN, Underwood LE, Voina SJ, Foushee DB, Van Wyk JJ.** 1974. Characterization of the insulin and somatomedin C receptors in human placental cell membranes. *J Clin Endocrinol Metab* 39:283.
194. **Daughaday WH, Mariz IK, Trivedi B.** 1981. Preferential binding site for insulin-like growth factor II in human and rat placental membranes. *J Clin Endocrinol Metab* 53:282.
195. **Potau N, Rinder E, Ballabriga A.** 1981. Insulin receptors in human placenta in relation to fetal weight and gestational age. *Pediatric Res* 15:798.
196. **Davenport ML, Clemmons DR, Miles MV, Camacho-Hubner C, D'Ercole JA, Underwood LE.** 1990. Regulation of serum insulin-like growth factor-I (IGF-I) and IGF binding proteins during rat pregnancy. *Endocrinology* 127:1278.

197. **Donovan SM, Giudice LC, Murphy LJ, Hintz RL, Rosenfeld RG.** 1991. Maternal insulin-like growth factor-binding protein messenger ribonucleic acid during rat pregnancy. *Endocrinology* 129:3359.
198. **Wilson DM, Bennet A, Adamson GD, Nagashima RJ, Liu F, De Natale ML, Hintz RL, Rosenfeld RG.** 1982. Somatomedins in pregnancy: a cross-sectional study of insulin-like growth factor I and II and somatomedin peptide content in normal human pregnancies. *J Clin Endocrinol Metab* 55:858.
199. **Hall K, Enberg G, Hellum E, Lundin G, Ottosson-Seeberger A, Sara V, Trygstad O, Ofverholm U.** 1984. Somatomedin levels in pregnancy: longitudinal study in healthy subjects and patients with growth hormone deficiency. *J Clin Endocrinol Metab* 59:587.
200. **Gargosky SE, Owens PC, Walton PE, Owens JA, Robinson JS, Wallace JC, Ballard FJ.** 1991. Most of the circulating insulin-like growth factors-I and -II are present in the 150 kDa complex during human pregnancy. *J Endocrinol* 131:491.
201. **Suikkari AM, Baxter RC.** 1992. Insulin-like growth factor-binding protein-3 is functionally normal in pregnancy serum. *J Clin Endocrinol Metab* 74:177.
202. **Drop SLS, Kortleve DJ, Guyda HJ, Posner BI.** 1984. Immunoassay of somatomedin-binding protein from human amniotic fluid: levels in fetal, neonatal and adult sera. *J Clin Endocrinol Metab* 59:908.
203. **Hall K, Hansson U, Lundin G, Luthman M, Persson B, Póvoa G, Stangenberg M, Ofverholm U.** 1986. Serum levels of somatomedin and somatomedin-binding protein in pregnant women with type I or gestational diabetes and their infants. *J Clin Endocrinol Metab* 63:1300.
204. **Julkunen M, Koistinen R, Aalto-Setälä K, Seppälä M, Jänne OA, Kontula K.** 1988. Primary structure of human insulin-like growth factor binding protein/placental protein 12 and tissue specific expression of its mRNA. *FEBS Lett* 236:295.
205. **Wahstrom T, Seppälä M.** 1984. Placental protein 12 (PP 12) is induced in the endometrium by progesterone. *Fertil Steril* 41:781.
206. **Gargosky SE, Walton PE, Owens PC, Wallace JC, Ballard FJ.** 1990. Insulin-like growth factor-I (IGF-I) and IGF-binding proteins both decline in the rat during late pregnancy. *J Endocrinol* 127:383.
207. **Suikkari AM, Baxter RC.** 1991. Insulin-like growth factor (IGF) binding protein-3 in pregnancy serum binds native IGF-I but not iodo-IGF-I. *J Clin Endocrinol Metab* 73:1377.

208. **Clemmons DR, Underwood LE.** 1991. Nutritional regulation of IGF-I and IGF binding proteins. *Annu Rev Nutr* 11:393.
209. **Phillips LS, Young HS.** 1976. Nutrition and somatomedin. I. Effects of fasting and refeeding on serum somatomedin activity and cartilage growth activity in rats. *Endocrinology* 99:304.
210. **Grant DB, Hambley J, Becker D., Pimstone BL.** 1973. Reduced sulphation factor in undernourished children. *Arch Dis Child* 48:596.
211. **Davenport ML, Svoboda ME, Koerber KL, Van Wyk JJ, Clemmons DR, Underwood LE.** 1988. Plasma concentrations of insulin-like growth factor II (IGF-II) are not changed by short term fasting and refeeding. *J Clin Endocrinol Metab* 67:1231.
212. **Emler CA, Schalch DS.** 1987. Nutritionally-induced changes in hepatic insulin-like growth factor I (IGF-I) gene expression in rats. *Endocrinology* 120:832.
213. **Lowe WJ, Adamo M, Werner H, Roberts CT, LeRoith D.** 1989. regulation by fasting of insulin-like factor I and its receptor: effects on gene expression and binding. *J Clin Invest* 84:619.
214. **Straus DS, Takemoto CD.** 1990. Effect of fasting on insulin-like growth factor-I (IGF-I) and growth hormone receptor mRNA levels and IGF-I gene transcription in rat liver. *Mol Endocrinol* 4:91.
215. **Moats-Staats BM, Brady JL, Underwood LE, D'Ercole AJ.** 1984. Dietary protein restriction in artificially reared neonatal rats causes a reduction in insulin-like growth factor I (IGF-I) gene expression. *Endocrinology* 125:2368.
216. **Bornfelt KE, Arnqvist HJ, Engberg B, Mathews LS, Norstedt G.** 1989. Regulation of insulin-like growth factor-I and growth hormone receptor gene expression by diabetes and nutritional state in rat tissues. *J Endocrinol* 122:651.
217. **VandeHaar MJ, Moats-Staats BM, Davenport ML, Walker JL, Ketelslegers JM, Sharma BK, Underwood LE.** 1991. Reduced serum concentration of insulin-like growth factor-I (IGF-I) in protein-restricted growing rats are accompanied by reduced IGF-I mRNA levels in liver and skeletal muscle. *J Endocrinol* 130:305.
218. **Thissen JP, Triest S, Moats-Staats BM, Underwood LE, Mauerhoff T, Maiter D, Ketelslegers JM.** 1991. Evidence that pretranslational and translational defects decrease serum insulin-like growth factor-I concentrations during dietary protein restriction. *Endocrinology* 129:429.

219. **Thissen JP, Davenport ML, Pucilowska JP, Miles MV, Underwood LE.** 1992. Increased serum clearance and degradation of 125I-labeled IGF-I in protein-restricted rats. *Am J Physiol* 262:E406.
220. **Maes M, Amand Y, Underwood LE, Maiter D, Ketelslegers JM.** 1988. Decreased serum insulin-like growth factor I response to GH in hypophysectomized rats fed a low protein diet: evidence for a post receptor defect. *Acta Endocrinol (Copenh)* 117:320.
221. **Maiter DM, Maes M, Underwood LE, Fliesen T, Gerard G, Ketelslegers JM.** 1988. Early changes in serum concentrations of somatomedin-C induced by dietary protein deprivation: contributions of growth hormone receptor and post-receptor defects. *J Endocrinol* 118:113.
222. **Fliesen T, Maiter DM, Gerard G, Underwood LE, Maes M, Ketelslegers JM.** 1989. Reduction in insulin-like growth factor I by dietary protein restriction is age dependent. *Pediatr Res* 26:415.
223. **Prewitt TE, D'Ercole AJ, Switzer BR, Van Wyk JJ.** 1982. Relationship of serum immunoreactive somatomedin-C to dietary protein and energy in growing rats. *J Nutr* 112:144.
224. **Philipps A, Drakenberg K, Persson B, Sjögren B, Eklöf C, Hall K, Sara V.** 1989. The effects of altered nutritional status upon insulin-like growth factors and their binding proteins in neonatal rats. *Pediatr Res* 26:128.
225. **Thissen JP, Underwood LE, Maiter D, Maes M, Clemmons DR, Ketelslegers JM.** 1991. Failure of IGF-I infusion to promote growth in protein-restricted rats despite normalization of serum IGF-I concentrations. *Endocrinology* 128:885.
226. **Jakob R, Barrett E, Plewe G, Fagin KD, Sherwin RS.** 1989. Acute effects of insulin-like growth factor I on glucose and amino acid metabolism in the awake fasted rat. *J Clin Invest* 83:1717.
227. **O'Sullivan U, Gluckman PD, Breier BH, Woodall S, Siddiqui R, McCutcheon SN.** 1989. Insulin-like growth factor-I (IGF-I) in mice reduces weight loss during starvation. *Endocrinology* 125:2793.
228. **Dauncey MJ, Rudd BT, White DA, Shakespear RA.** 1993. Regulation of insulin-like growth factor-binding proteins in young growing animals by alteration of energy status. *Growth Regul* 3:198.
229. **Donovan SM, Atilano LC, Hintz RL, Wilson DM, Rosenfeld RG.** 1991. Differential regulation of the insulin-like growth factors (IGF-I and -II) and IGF binding proteins during malnutrition in the neonatal rat. *Endocrinology* 129:149.

230. **Maes M, Underwood LE, Ketelslegers JM.** 1986. Low serum somatomedin-C in insulin-dependent diabetes: evidence for a post receptor mechanism. *Endocrinology* 118:377.
231. **Baxter RC, Brown AS, Turtle JR.** 1980. Association between serum insulin, serum somatomedin and liver receptors for human growth hormone in streptozotocin diabetes. *Horm Metab Res* 12:377.
232. **Olchowsky D, Song J, Gelato MC, Sherwood J, Spatola E, Brun JF, Berelowitz M.** 1993. Pituitary and hypothalamic insulin-like growth factor-I (IGF-I) and IGF-I receptor expression in food-deprived rats. *Mol Cell Endocrinol* 93:193.
233. **Dardevet D, Manin M, Balage M, Sornet C, Grizard J.** 1991. Influence of low- and high-protein diets on insulin and insulin-like growth factor-1 binding to skeletal muscle and liver in the growing rat. *Br J Nutr* 65:47.
234. **Rosenfeld RG, Dollar LA.** 1982. Characterization of the somatomedin C/insulin-like growth factor-I (SM-C/IGF-I) receptor on cultured human fibroblast monolayers: regulation of receptor concentrations by SM-C/IGF-I and insulin. *J Clin Endocrinol Metab* 55:434.
235. **Falconer J, Forbes JM, Hart IC, Robinson JS, Thorburn GD.** 1979. Somatomedin-like activity (SLA) in plasma after fetal hypophysectomy or nephrectomy and in experimental intrauterine growth retardation in sheep. *J Endocrinol* 83:119.
236. **Jones CT, Lafeber HN, Rolph TP, Parer JT.** 1990. Studies on the growth of the fetal guinea pig. The effects of nutritional manipulation on prenatal growth and plasma somatomedin activity and IGF concentrations. *J Develop Physiol* 13:189.
237. **Foley TPJ, DePhilip R, Perricelli A, Miller A.** 1980. Low somatomedin activity in cord serum from infants with intrauterine growth retardation. *J Paediatrics* 96:605.
238. **Hill D, Fekete M, Milner D.** 1983. Reduced plasma somatomedin activity during experimental growth retardation in fetal and neonatal rat. En "Insulin-like Growth Factors/Somatomedins", p. 345. Spencer EM (ed.). De Gruyter, Berlín.
239. **Pilistine SJ, Moses AC, Munro HN.** 1984. Placental lactogen administration reverses the effect of low-protein diet on maternal and fetal serum somatomedin levels in the pregnant rat. *Proc Natl Acad Sci USA* 81:5853.
240. **Davenport ML, D'Ercole AJ, Underwood LE.** 1990. Effects of maternal fasting on fetal growth, serum IGFs and tissue IGF mRNAs. *Endocrinology* 126:2062.



241. **Straus DS, Ooi GT, Orlowsky CC, Rechler MM.** 1991. Expression of the genes for insulin-like growth factor-I (IGF-I), IGF-II and the IGF-binding proteins-1 and 2 in the fetal rat under conditions of intrauterine growth retardation caused by maternal fasting. *Endocrinology* 128:518.
242. **Dwyer CM, Stickland MC.** 1992. The effects of maternal undernutrition on maternal and fetal serum insulin-like growth factors, thyroid hormones and cortisol in the guinea pig. *J Develop Physiol* 18:303.
243. **Gluckman PD, Butler JH.** 1985. Insulin-like growth factors in the fetus. En "The Physiological Development of the Fetus and the Newborn", p 21. Jones CT, Nathanielsz PW (eds.). Academic Press, Londres.
244. **Unterman T, Lascon R, Gotway MB, Oehler D, Gounis A, Simmons RA, Ogata ES.** 1990. Circulating levels of insulin-like growth factor binding protein-1 (IGFBP-1) and hepatic mRNA are increased in the small for gestational age (SGA) fetal rat. *Endocrinology* 127:2035.
245. **Unterman TG, Simmons RA, Glick RP, Ogata ES.** 1993. Circulating levels of insulin, insulin-like growth factor-I (IGF-I), IGF-II, and IGF-binding proteins in the small for gestational age fetal rat. *Endocrinology* 132:327.
246. **Price WA, Stiles AD, Moats-Staats BM, D'Ercole AJ.** 1992. Gene expression of insulin-like growth factors (IGFs), the type I IGF receptor, and IGF-binding proteins in dexametasone-induced fetal growth retardation. *Endocrinology* 130:1424.
247. **Osborn BH, Fowlkes J, Han VKM, Freemark M.** 1992. Nutritional regulation of insulin-like growth factor-binding protein gene expression in the ovine fetus and pregnant ewe. *Endocrinology* 131:1743.
248. **Wang HS, Lim J, English J, Irvine L, Chard T.** 1991. The concentration of insulin-like growth factor-I (IGF-I) and insulin-like growth factor-binding protein-1 (IGFBP-1) in human umbilical cord serum at delivery: relation to fetal weight. *J Endocrinol* 129:459.
249. **Giustina A, Ruggeri G, Bodini C, Bossoni S, Girelli A, Schettino M, Pozzi A, Valentini U, Bellotti S, Albertini A, Giustina G.** 1992. Insulin-like growth factor 1 and growth hormone levels in patients with type 1 diabetes mellitus. En "Growth Factors of the Vascular and Nervous Systems". Int. Symp. on Biotechnology of Growth Factors, Milán, mayo 1991. Lenfant C, Paoletti R, Albertini A (eds.). Karger, Basilea.
250. **Scott CD, Baxter RC.** 1986. Production of insulin-like growth factor I and its binding protein in rat hepatocytes cultured from diabetic and insulin-treated diabetic rats. *Endocrinology* 119:2346.

251. **Scheiwiller E, Guler HP, Merryweather J et al.** 1986. Growth restoration of insulin-deficient diabetic rats by recombinant human insulin-like growth factor I. *Nature* 323:169.
252. **Hayford JT, Danney MM, Hendrix JA, Thompson R.** 1980. Integrated concentration of growth hormone in juvenile-onset diabetes. *Diabetes* 29:391.
253. **Holly JMP, Smith CP, Dunger DB, Edge JA, Biddlecombe RA, Williams AJK, Howell R, Chard T, Savage MO, Rees LH, Wass JAH.** 1989. Levels of the small insulin-like growth factor-binding protein are strongly related to those of insulin in prepubertal and pubertal children but only weakly so after puberty. *J Endocrinol* 121:383.
254. **Taylor AM, Dunger DB, Preece MA, Holly JMP, Smith CP, Wass JAH, Patel S, Tate VE.** 1990. The growth hormone independent insulin-like growth factor-I binding protein BP-28 is associated with serum insulin-like growth factor-I inhibitory bioactivity in adolescent insulin-dependent diabetics. *Clin Endocrinol* 32:229.
255. **Werner H, Shen-Orr Z, Stannard B, Burguera B, Roberts CT, LeRoith D.** 1990. Experimental diabetes increases insulin-like growth factor I and II receptor concentration and gene expression in the kidney. *Diabetes* 39:1490.
256. **Bach LA.** 1992. IGF-I and IGF binding proteins in diabetes-related kidney growth. *Growth Regul* 2:30.
257. **Kusin JA, Kardjati S, Renqvist UH.** 1993. Chronic undernutrition in pregnancy and lactation. *Proc Nutr Soc* 52:19.
258. **Rodríguez C.** 1990. Alteraciones metabólico-endocrinas en ratas subnutridas desde la etapa fetal. Tesis Doctoral. Fac. de farmacia, Univ. Complutense. Madrid.
259. **Crnic LS, Chase HP.** 1978. Models of infantile undernutrition in rats: effects on milk. *J Nutr* 108:1755.
260. **Okitolonda W, Brichard SM, Pottier AM, Henquin JC.** 1988. Influence of low- and high-protein diets on glucose homeostasis in the rat. *Br J Nutr* 60:509.
261. **Young CM, Rasmussen KM.** 1985. Effects of varying degrees of chronic dietary restriction in rat dams on reproductive and lactational performance and body composition in dams and their pups. *Am J Clin Nutr* 41:979.
262. **Hall K.** 1970. Quantitative determination of the sulfation factor activity in human serum. *Acta Endocrinol (Copenh)* 63:338.

263. **Guyda HJ, Rappaport R.** 1990. Insulin-like growth factors. En "Pediatric Endocrinology", 2nd edition. Coolu R, Ducharme JR, Guyda HJ (eds.) 217. Raven Press, Nueva York.
264. **Hintz RL, Clemmons DR, Underwood LE, Van Wyk JJ.** 1972. Competitive binding of somatomedin to the insulin receptors of adipocytes, chondrocytes and liver membranes. *Proc Natl Acad Sci USA* 69:2351.
265. **Van Wyk JJ, Underwood LE, Baseman JB, Hintz RL, Clemmons DR, Marshall RN.** 1975. Explorations of the insulin-like and growth-promoting properties of somatomedin by membrane receptor assays. *Adv Metab Disord* 8:128.
266. **Daughaday WH.** 1987. Radioligand assays for insulin-like growth factor II. *Methods in Enzymology* 146:248.
267. **Horner JM, Liu F, Hintz RL.** 1978. Comparison of [<sup>125</sup>I]-somatomedin-C radioreceptor assays for somatomedin peptide content in whole and acid chromatographed plasma. *J Clin Endocrinol Metab* 47:1287.
268. **Daughaday WH, Mariz IK, Blethen SL.** 1980. Inhibition of access of bound somatomedin to membrane receptor and immunobinding sites: a comparison of radioreceptor and radioimmunoassay of somatomedin and acid-ethanol extracted serum. *J Clin Endocrinol Metab* 51:781.
269. **Underwood LE, D'Ercole AJ, Kopeland KC, Van Wyk JJ, Hurley T, Handwerger S.** 1982. Development of a heterologous radioimmunoassay for somatomedin C in sheep blood. *J Endocrinol* 93:31.
270. **Daughaday WH, Kapadia M, Mariz IK.** 1987. Serum somatomedin binding proteins: physiologic significance and interference in radioligand assays. *J Lab Clin Med* 109:355.
271. **Bowsher RR, Lee WH, Apathy JM, O'Brien PJ, Ferguson AL, Henry DP.** 1991. Measurement of insulin-like growth factor-II in physiological fluids and tissues. I. An improved extraction procedure and radioimmunoassay for human and rat fluids. *Endocrinology* 128:805.
272. **Baxter RC.** 1991. Biochemical characterization of insulin-like growth factor binding proteins. *Acta Endocrinol (Copenh)* 124:33.
273. **Haselbacher GK, Andres RY, Humbel RE.** 1980. Evidence for the synthesis of a somatomedin similar to the insulin-like growth factor I by chicken embryo liver cells. *Eur J Biochem* 111:245.

274. **Wilkins JR, D'Ercole AJ.** 1985. Affinity-labeled plasma somatomedin C/insulinlike growth factor I binding proteins. *J Clin Inves* 69:1239.
275. **Rutanen EM, Pekonen F.** 1991. Assays for IGF binding proteins. *Acta Endocrinol (Copenh)* 124:70.
276. **Hossenlopp P, Seurin D, Segovia-Quinson B, Hardouin S, Binoux M.** 1986. Analysis of serum insulin-like growth factor binding proteins using Western blotting: use of the method for titration of the binding proteins and competitive binding studies. *Anal Biochem* 154:138.
277. **Grissom F, Rivero-Crespo F, Lindgren B, Hall K.** 1993. Ligand blot analysis: validation of capabilities and utilization for measurement of truncated insulin-like growth factor regulation of Hep-G2 insulin-like growth factor binding protein-1 production. *Anal Biochem* 212:412.
278. **Escrivá F, Rodríguez C, Cacho J, Alvarez C, Portha B, Pascual-Leone AM.** 1992. Glucose utilization and insulin action in adult rats submitted to prolonged food restriction. *Am J Physiol* 263:E1.
279. **Breier BH, Gallaher BW, Gluckman PD.** 1991. Radioimmunoassay for insulin-like growth factor-I: solutions to some potential problems and pitfalls. *J Endocrinol* 128:347.
280. **Hunter WM, Greenwood FC.** 1962. Preparation of iodine-131 labelled human growth hormone of high specific activity. *Nature* 194:495.
281. **Lowry OH, Rosenbrough NJ, Farr AL, Randall RJ.** 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193:265.
282. **Laemmli UK.** 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680.
283. **Bers G, Garfin D.** 1985. Protein and nucleic acid blotting and immunochemical detection. *Biotechniques* 3:275.
284. **Havrankova J, Roth J, Brownstein MJ.** 1978. Insulin receptors are widely distributed in the central nervous system of the rat. *Nature* 272:827.
285. **Scatchard G.** 1949. The attraction of proteins for small molecules and ions. *Ann N Y Acad Sci* 51:660.
286. **Furlanetto RW, Underwood L, Van Wyk JJ, D'Ercole AJ.** 1977. Estimation of somatomedin-C levels in normals and patients with pituitary disease by radioimmunoassay. *J Clin Invest* 60:648.

287. **Hall K, Brandt J, Engberg G, Fryklund L.** 1982. Immunoreactive somatomedin A in human serum. *J Clin Endocrinol Metab* 54:1084.
288. **Furlanetto RW.** 1982. Pitfalls in the somatomedin-C radioimmunoassay. *J Clin Endocrinol Metab* 54:1084.
289. **Furlanetto RW, Marino JM.** 1987. Radioimmunoassay of somatomedin-C/insulin-like growth factor I. *Methods in Enzymology* 146A:216.
290. **Blum WF, Ranke MB, Bierich JR.** 1988. A specific Radioimmunoassay for insulin-like growth factor II: the interference of IGF-binding proteins can be blocked by excess IGF-I. *Acta Endocrinol (Copenh)* 118:374.
291. **Bang P, Eriksson U, Sara V, Wiwall IL, Hall K.** 1991. Comparison of acid ethanol extraction and acid gel filtration prior to IGF-I and IGF-II radioimmunoassay: improvement of determinations in acid ethanol extracts by the use of truncated IGF-I as radioligand. *Acta Endocrinol (Copenh)* 124:620.
292. **Megyesi K, Kahn CR, Roth J, Gordon P.** 1975. Circulating NSILA-S in man: studies of stimuli in vivo and of binding to plasma components. *J Clin Endocrinol Metab* 41:475.
293. **Zapf J, Walter H, Froesch ER.** 1981. Radioimmunological determination of insulin-like growth factors I and II in normal subjects and in patients with growth disorders and extrapancreatic tumor hypoglycemia. *J Clin Invest* 68:1321.
294. **Franklin RC, Rennie GG, Burger HG, Cameron DP.** 1976. A bioassay for NSILA-S in individual serum samples and its relationship to somatotrophin. *J Clin Endocrinol Metab* 43:1164.
295. **Mesiano S, Young IR, Browne CA, Thorburn GD.** 1988. Failure of acid-ethanol treatment to prevent interference by binding proteins in radioligand assays for the insulin-like growth factors. *J Endocrinol* 119:453.
296. **Crawford BA, Martin JL, Howe CJ, Handelsman DJ, Baxter RC.** 1992. Comparison of extraction methods for insulin-like growth factor-I in rat serum. *J Endocrinol* 134:169.
297. **Baxter RC, Martin JL.** 1987. Binding proteins for insulin-like growth factors in adult rat serum. Comparison with other human and rat binding proteins. *Biochem Biophys Res Commun* 147:408.
298. **Cheung PT, Smith EP, Shimasaki S, Ling N, and Chernausk SD.** 1991. Characterization of an insulin-like growth factor binding protein (IGFBP-4) produced by the B104 rat neuronal cell line: Chemical and biological properties and differential synthesis by sublines. *Endocrinology* 129:1006.

299. **Shimasaki, S., Uchiyama F, Shimonaka M, Ling N** 1990. Molecular cloning of cDNAs encoding a novel insulin-like growth factor-binding protein from rat and human. *Mol Endocrinol* 4:1451.
300. **Rivero F, Goya L, Pascual-Leone AM** 1994. Comparison of extraction methods for insulin-like growth factor-binding proteins (IGFBPs) prior to IGF-I measurement in undernourished neonatal and adult rat serum. *J Endocrinol* (en prensa)
301. **Draznin B, Morris HG, Burstein BP, Schlach DS.** 1979. Serum growth hormone, somatomedin and its carrier protein in the rat: influence of age, sex and pregnancy. *Proc Soc Exp Biol Med* 162:131.
302. **Sheppard MS, Bala RM.** 1986. Profile of serum immunoreactive insulin-like growth factor-I during gestation in Wistar rats. *Can J Physiol Pharmacol* 64:521.
303. **Fielder PJ, Thordarson G, Talamantes F, Rosenfeld RG.** 1990. Characterization of insulin-like growth factor binding proteins (IGFBPs) during gestation in mice: effects of hypophysectomy and an IGFBP-specific serum protease activity. *Endocrinology* 127:2270.
304. **Travers MT, Madon RJ, Flint DJ.** 1993. Regulation of serum insulin-like growth factor-I (IGF-I), hepatic growth hormone binding and IGF-I gene expression in the rat during pregnancy and lactation. *J Endocrinol* 139:89.
305. **Gargosky SE, Moyse KJ, Walton PE, Owens JA, Wallace JC, Robinson JS, Owens PC.** 1990. Circulating levels of insulin-like growth factors increase and molecular forms of their serum binding proteins change with human pregnancy. *Biochem Biophys Res Commun* 170:1157.
306. **Wang HS, Chard T.** 1992. Chromatographic characterization of insulin-like growth factor-binding proteins in human pregnancy serum. *J Endocrinol* 133:149.
307. **Davenport M, Pucilowska J, Clemmons DR, Lundblad R, Spencer JA, Underwood LE.** 1992. Tissue-specific expression of insulin-like growth factor binding protein-3 protease activity during rat pregnancy. *Endocrinology* 130:2505.
308. **Davies SC, Holly JMP, Coulson VJ, Cotterill AM, Abdulla AF, Whittaker PG, Chard T, Wass JAH.** 1991. The presence of cation dependent proteases for insulin-like growth factor binding proteins does not alter the size distribution of insulin-like growth factors in pregnancy. *Clin Endocrinol* 34:501.
309. **Frost VJ, Macaulay VM, Wass JAH, Holly JMP.** 1993. Proteolytic modification of insulin-like growth factor-binding proteins: comparison of conditioned media from human cell lines, circulating proteases and characterized enzymes. *J Endocrinol* 138:545.

310. **Metcalf J, Stock MK, Barron DH.** 1988. Maternal physiology during gestation. En "The Physiology of Reproduction", p. 2145. Knobil E, Neill J, Ewing LL, Greenwald GS, Markert CL, Pfaff DW (eds.). Raven Press, Nueva York.
311. **Carlsson L, Eden S, Jansson JO.** 1990. The plasma pattern of growth hormone in conscious rats during late pregnancy. *J Endocrinol* 124:191.
312. **Gargoski SE, Owens JA, Walton PE, Owens PC, Wallace JC, Ballard FJ.** 1991. Administration of insulin-like growth factor-I, but not growth hormone, increases maternal weight gain in late pregnancy without affecting fetal or placental growth. *J Endocrinol* 130:395.
313. **Hurley TW, D'Ercole AJ, Handwerger S, Underwood LE, Furlanetto RW, Fellows RE.** 1977. Ovine placental lactogen induces somatomedin: a possible role in fetal growth. *Endocrinology* 101:1635.
314. **Daughaday WH, Trivedi B, Kapadia M.** 1979. The effect of hypophysectomy on rat chorionic somatomammotrophin as measured by prolactin and growth hormone radioreceptor assays; possible significance in maintenance of somatomedin generation. *Endocrinology* 105:210.
315. **Kervran A, Randon J, Girard JR.** 1977. Dynamics of glucose-induced insulin release by fetal rat pancreas in vitro: potentiating effect of amino acids. *Diabetologia* 13:408.
316. **Alvarez C, Escrivá F, Pascual-Leone AM.** 1992. Effect of growth hormone on liver glycogen accumulation in suckling rats. *Hormone Res* 37:39.
317. **Gluckmann PD, Butler JH, Comline R, Fowden A.** 1987. The effects of pancreatectomy on the plasma concentration of insulin-like growth factors 1 and 2 in the sheep fetus. *J Dev Physiol* 9:79.
318. **Girard J, Sperling M.** 1983. Glucagon in the fetus and the newborn. En "Glucagon", vol 2, p 251. PJ Lefebvre (ed). Springer-Verlag, Berlín.
319. **Jones CT, Lafeber HN, Price DA, Parer JT.** 1987. Studies on the growth of the fetal guinea pig. Effects of the reduction in the uterine blood flow on the plasma sulphation-promoting activity and on the concentration of the insulin-like growth factors-I and -II. *J Develop Physiol* 9:181.
320. **Jones CT, Gu W, Harding JE, Price DA, Parer JT.** 1988. Studies on the growth of the fetal sheep. Effects of surgical reduction in placental size, or experimental manipulation of uterine blood flow on plasma sulphation promoting activity and on the concentration of IGF-I and -II. *J Develop Physiol* 10:179.

321. **Hill WC, Pelle-Day G, Kitzmiller JL, Spencer EM.** 1989. Insulin-like growth factors in fetal macrosomia with and without maternal diabetes. *Hormone Res* 32:178.
322. **Hausmann GJ, Campion DR, Buonomo FC.** 1991. Concentration of IGF-I and IGF-II in tissues of developing lean and obese pig foetuses. *Growth, Development and Aging* 55:43.
323. **Vilesis RA, D'Ercole AJ.** 1986. Tissue and serum concentrations of Sm-C/IGF-I in fetal rats made growth retarded by uterine artery ligation. *Pediatr Res* 20:126.
324. **Lewitt MS, Baxter RC.** 1989. Regulation of growth hormone-independent insulin-like growth factor-binding protein (BP-28) in cultured human liver explants. *J Clin Endocrinol Metab* 69:246.
325. **Unterman TG, Glick RP, Hollis RF, Simmons RA, Gounis AS, Ogata ES.** 1990. Insulin-like growth factor-I (IGF-I), insulin and nutritional status are reduced in the small for gestational age (SGA) fetal rat. *Clin Res* 38:324.
326. **Glasscock GF, Gelber SE, Lamson G, McGee-Tekula R, Rosenfeld RG.** 1990. Pituitary control of growth in the neonatal rat: effects of neonatal hypophysectomy on somatic and organ growth, serum insulin-like growth factors (IGF)-I and -II levels, and expression of IGF binding proteins. *Endocrinology* 127:1729.
327. **Harel Z, Tannenbaum GS.** 1993. Dietary protein restriction impairs both spontaneous and growth hormone-releasing factor-stimulated growth hormone release in the rat. *Endocrinology* 133:1035.
328. **Olchovsky D, Bruno JF, Wood TL, Gelato MC, Leidy JW, Gilbert JM, Berelowitz M.** 1990. Altered pituitary growth hormone (GH) regulation in streptozotocin-diabetic rats: a combined defect of hypothalamic somatostatin and GH-releasing factor. *Endocrinology* 126:53.
329. **Domené H, Krishnamurthi K, Eshet R, Gilad I, Laron Z, Koch I, Stannard B, Cassorla F, Roberts CT, LeRoith D.** 1993. Growth hormone (GH) stimulates insulin-like growth factor-I (IGF-I) and IGF-I-binding protein-3, but not GH receptor gene expression in livers of juvenile rats. *Endocrinology* 133:675.
330. **Phillips LS, Young HS.** 1976. Nutrition and somatomedin. II. Serum somatomedin activity and cartilage growth activity in streptozotocin-diabetic rats. *Diabetes* 25:516.
331. **Binz K, Zapf J, Froesch ER.** 1989. The role of insulin-like growth factor I in growth of diabetic rats. *Acta Endocrinol (Copenh)* 121:628.



332. **Pao C, Farmer PK, Begovic S, Goldstein S, Wu G, Phillips LS.** 1992. Expression of hepatic insulin-like growth factor-I and insulin-like growth factor-binding protein-1 genes is transcriptionally regulated in streptozotocin-diabetic rats. *Mol Endocrinol* 6:969.
333. **Takahashi S, Kajikawa M, Umezawa T, Takahashi SI, Kato H, Miura Y, Nam TJ, Noguchi T, Naito H.** 1990. Effects of dietary proteins on plasma immunoreactive insulin-like growth factor-I/somatomedin-C concentration in the rat. *Br J Nutr* 63:521.
334. **Miura Y, Kato H, Noguchi T.** 1992. Effects of dietary proteins on insulin-like growth factor-1 (IGF-1) messenger ribonucleic acid content in rat liver. *Br J Nutr* 67:257.
335. **Tannenbaum GS.** 1981. Growth hormone secretory dynamics in streptozotocin diabetes: evidence of a role for endogenous circulating somatostatin. *Endocrinology* 108:76.
336. **González C, Jolín T.** 1985. Effects of streptozotocin diabetes and insulin replacement on growth hormone in rats. *J Endocrinol Invest* 8:7.
337. **Olchovsky D, Bruno JF, Gelato MC, Song J, Berelowitz M.** 1991. Pituitary insulin-like growth factor-I content and gene expression in the streptozotocin-diabetic rat: evidence for tissue-specific regulation. *Endocrinology* 128:923.
338. **Berelowitz M, Szabo M, Frohman LA, Firestone S, Chu L, Hintz RL.** 1981. Somatomedin-C mediates growth hormone negative feed-back by effects on both the hypothalamus and the pituitary. *Science* 212:1279.
339. **Hall K, Johansson BL, Póvoa G, Thalme B.** 1989. Serum levels of insulin-like growth factor (IGF) I, II and IGF binding protein in diabetic adolescents treated with continuous subcutaneous insulin infusion. *J Int Med* 225:273.
340. **Merimée TJ, Zapf J, Froesch ER.** 1983. Insulin-like growth factors. Studies in diabetics with and without retinopathy. *N Engl J Med* 305:303.
341. **Merimée TJ, Gardner DF, Zapf J, Froesch ER.** 1984. Effect of glycemic control on serum insulin-like growth factors in diabetes mellitus. *Diabetes* 33:790.
342. **Leaman DW, Simmen FA, Ramsay TG, White ME.** 1990. Insulin-like growth factor-I and -II messenger RNA expression in muscle, heart, and liver of streptozotocin-diabetic swine. *Endocrinology* 126:2850.
343. **Busby WH, Snyder DK, Clemmons DR.** 1988. Radioimmunoassay of a 26000-dalton plasma insulin-like growth factor-binding protein: control by nutritional variables. *J Clin Endocrinol Metab* 67:1225.

344. **McCusker RH, Cohick WS, Busby WH, Clemmons DR.** 1991. Evaluation of the developmental and nutritional changes in porcine insulin-like growth factor-binding protein-1 and -2 serum levels by immunoassay. *Endocrinology* 129:2631.
345. **Luo J, Murphy LJ.** 1991. Differential expression of insulin-like growth factor-I and insulin-like growth factor-binding protein-1 in the diabetic rat. *Mol Cell Biochem* 103:41.
346. **Hochberg Z, Hertz P, Colin V, Ish-Shalom S, Yeshurun D, Youdim MBH, Amit T.** 1992. The distal axis of growth hormone (GH) in nutritional disorders: GH-binding protein, insulin-like growth factor-I (IGF-I), and IGF-I receptors in obesity and anorexia nervosa. *Metabolism* 41:106.
347. **Bohannon NJ, Corp ES, Wilcox BJ, Figlewicz DP, Dorsa DM, Baskin DG.** 1988. Characterization of insulin-like growth factor I receptors in the median eminence of the brain and their modulation by food restriction. *Endocrinology* 122:1940.
348. **Phillips LS, Fusco AC, Unterman TG.** 1985. Nutrition and somatomedin: XIV. Altered levels of somatomedins and somatomedin inhibitors in rats with streptozotocin-induced diabetes. *Metabolism* 34:765.
349. **Tomas FM, Knowles SE, Owens PC, Chandler CS, Francis GL, Ballard FJ.** 1993. Insulin-like growth factor-I and more potent variants restore growth of diabetic rats without inducing all characteristic insulin effects. *Biochem J* 291:781.
350. **Graubert MD, Goldstein S, Phillips LS.** 1991. Nutrition and somatomedin. XXVII. Total and free IGF-I and IGF binding proteins in rats with streptozotocin-induced diabetes. *Diabetes* 40:959.